



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**OBTENÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA,
OLIGOSSACARÍDEOS E FRUTOSE
POR VIA ENZIMÁTICA**

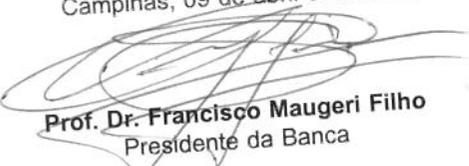
Saartje Hernalsteens

Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Saartje Hernalsteens**, aprovada pela Comissão Julgadora em 09 de abril de 2002.

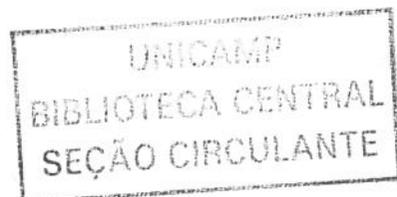
Campinas, 09 de abril de 2002


Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Presidente da Banca

Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão de pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos, na área de concentração de Bioprocessos.

Campinas, janeiro de 2002

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**



UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
H43o
V _____ EX _____
TOMBO BCI 49155
PROC 16.837102
C _____ D1 _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA _____
Nº CPD _____

CM00167662-6

BIB ID 241041

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

H43o Hernalsteens, Saartje
Obtenção da dextrana clínica, oligossacarídeos e frutose por
via enzimática / Saartje Hernalsteens. – Campinas, SP: [s.n.],
2002.

Orientador: Francisco Maugeri Filho
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

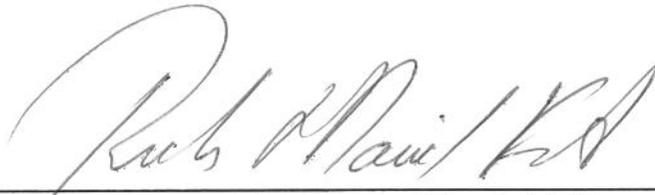
1.Frutose. 2.*Leuconostoc mesenteroides*. 3.Zeolitas.
I.Maugeri Filho, Francisco. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

Banca Examinadora



Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Profa. Maria Isabel Rodrigues



Prof. Rubens Maciel Filho



Prof. Silvio Andrietta

20022445

Dedicatórias

À minha família, por todo o apoio e incentivo recebido durante, não só estes dois anos de mestrado, mas sim pelos meus 24 anos de vida.

E ao Lucas, pelo companheirismo e amor.

Agradecimentos

Ao Prof. Francisco Maugeri Filho, pelo conhecimento, orientação e compreensão, durante todo o trabalho.

À Prof^a. Maia Isabel Rodrigues, pelo apoio.

À Fifa por toda a ajuda, que não foi pouca.

Aos amigos do laboratório, Fê, Keli, Lu, Lia, Marcio, Jana, Yemiko, Thiane, Daniel, André, Bernardo pelo apoio e principalmente pelos momentos vividos e curtidos.

Às amigas de curso, Cíntia, Marley, Adriana, Gra, entre outras.

A minhas amigas, Rô , Ana e Cla que sobreviveram ao meu sumiço e a minha sempre prometida, mas nunca cumprida, ida a São Paulo

À Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Departamento de Engenharia de Alimentos, por ter me transformado em uma engenheira e por proporcionar todas as condições necessárias para o desenvolvimento de minha pesquisa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior) pelo apoio financeiro, bolsa de demanda social.

E à todas as pessoas que conviveram comigo ou que só torceram pelo meu sucesso.

Sumário

Resumo	xiv
Summary	xv
1. Introdução	1
2. Objetivos	3
3. Revisão Bibliográfica	4
3.1. Dextrana-Sacarase	4
3.1.1. Propriedades	4
3.1.2. Microorganismo	5
3.1.3. Produção	5
3.1.4. Cinética enzimática	6
3.1.5. Definição de atividade enzimática	7
3.1.6. Mecanismo de ação catalítica	7
3.2. Dextrana	10
3.2.1. Propriedades	10
3.2.2. Aplicações	13
3.2.3. Produção	14
3.2.4. Fatores que afetam o peso molecular da dextrana	16
3.2.5. Redução da massa molecular – Hidrólise ácida	17
3.2.6. Fracionamento	18
3.3. Frutose	19
3.3.1. Aspectos gerais	19
3.3.2. Propriedades	20
3.3.3. Aplicações	20
3.3.4. Produção	21
3.4. Zeólitas	21

3.4.1. Generalidades	21
3.4.2. Separação da frutose	22
4. Material e métodos	25
4.1. Produção de dextrana nativa	25
4.1.1. Produção da enzima dextrana-sacarase	25
4.1.2. Síntese de dextrana	28
4.2. Obtenção de dextrana clínica	28
4.2.1. Hidrólise ácida	28
4.2.2. Precipitação	29
4.2.3. Fração Clínica	30
4.3. Recuperação da Frutose	33
4.3.1. Ultrafiltração	33
4.3.2. Coluna de separação com zeolitas BaY	33
4.4. Sistema de recuperação de oligossacarídeos e dextrana em FPLC ..	36
4.5. Métodos analíticos	37
4.5.1. Determinação da massa molecular de dextrana	37
4.5.2. Determinação de açúcares	40
4.5.3. Atividade enzimática	42
4.6. Rendimentos	43
4.6.1. Rendimento de dextrana e oligossacarídeos	43
4.6.2. Rendimento de frutose	43
5. Resultados e Discussão	44
5.1. Produção de dextrana-sacarase	44
5.2. Purificação da enzima	46
5.3. Síntese de dextrana bruta (nativa)	47
5.4. Obtenção de dextrana clínica	50
5.5. Obtenção de oligossacarídeos	57

5.6. Fracionamento	58
5.6.1. Determinação de X% e Y%	58
5.6.2. Estudo de Z%	61
5.6.3. Estudo da purificação da dextrana clínica	60
5.6.4. Tentativa de fracionamento das dextranas D75 e D40	63
5.6.5. Fracionamento a 15°C	64
5.7. Separação de frutose	66
5.7.1. Ultrafiltração	66
5.7.2. Coluna de separação com zeolita BaY	67
5.8. Recuperação de oligossacarídeos e dextrana em FPLC	68
5.8.1. Gel Superdex 75	69
5.8.2. Gel Superdex 200	70
5.9. Rendimentos	73
5.9.1. Rendimento de dextrana e oligossacarídeos na síntese	73
5.9.2. Rendimento de frutose produzida na síntese	74
5.9.3. Rendimento de dextrana e oligossacarídeos após hidrolise ácida	75
6. Conclusões	76
7. Sugestões para trabalhos futuros	78
8. Referências Bibliográficas	79

Lista de Tabelas

Tabela 01: Composição das dextranas produzidas por enzimas procedentes de alguns microorganismos (Sidebotham, 1974; López-Munguía, 1983)	12
Tabela 02: Composição do meio padrão (Guimarães, 1998)	25
Tabela 03: Condições experimentais para hidrólise ácida	29
Tabela 04: Porcentagens de etanol adicionadas no primeiro fracionamento	31
Tabela 05: Porcentagens de etanol adicionadas no estudo de Z%	32
Tabela 06: Porcentagens de etanol adicionadas no fracionamento a 15°C	32
Tabela 07: Características das colunas HILOAD 16/60	36
Tabela 08: Características das colunas utilizadas para determinação da distribuição porcentual da massa molecular da dextrana	38
Tabela 09: Massas moleculares dos padrões de dextrana utilizados para fazer a curva padrão.	38
Tabela 10: Composição de reagente DNS	42
Tabela 11: Atividade enzimática da dextrana-sacarase no final das fermentações	44
Tabela 12: Evolução da atividade enzimática durante a fermentação	45
Tabela 13: Acompanhamento da atividade enzimática durante a purificação da enzima dextrana-sacarase	46
Tabela 14: Evolução da síntese de dextrana com açúcar cristal e 40 UDS/ml	47

Tabela 15:	Evolução da síntese de dextrana com sacarose P.A. e 40 UDS/ml	48
Tabela 16:	Evolução da síntese de dextrana com açúcar cristal e 160 UDS/ml	48
Tabela 17:	Concentração de açúcares durante a síntese	49
Tabela 18:	Distribuição porcentual da massa molecular da dextrana obtida na 1 ^a hidrólise a 72°C e pH 1,0	51
Tabela 19:	Distribuição porcentual da massa molecular da dextrana obtida na 2 ^a hidrólise a 76°C e pH 1,0	53
Tabela 20:	Distribuição porcentual da massa molecular da dextrana obtida na 3 ^a hidrólise a 76°C e pH 1,5	55
Tabela 21:	Composição porcentual do sintetizado de baixa massa molecular	57
Tabela 22:	Composição porcentual do sintetizado de baixo peso molecular após hidrólise e ultrafiltração	58
Tabela 23:	Estudo do fracionamento (X%)	59
Tabela 24:	Primeiro estudo do fracionamento (X e Y%)	59
Tabela 25:	Segundo estudo do fracionamento (X e Y%)	60
Tabela 26:	Estudo de Z%	61
Tabela 27:	Estudo da purificação da fração clínica	62
Tabela 28:	Composição porcentual de dextrana clínica (D75 e D40)	63
Tabela 29:	Distribuição das massas moleculares no sobrenadante do fracionamento a 15°C (X%)	64
Tabela 30:	Estudo do fracionamento a 15°C (X e Y%)	65

Tabela 31: Eficiência do ultrafiltro na separação de frutose	66
Tabela 32: Avaliação em GPC da coluna com gel Superdex 75	69
Tabela 33: Avaliação em GPC da coluna com gel Superdex 200	71
Tabela 34: Avaliação em GPC da eluição de amostra após fracionamento a 15°C, em coluna com gel Superdex 200	72
Tabela 35: Rendimento das diversas frações de dextrana e oligossacarídeos na síntese	74
Tabela 36: Rendimento das diversas frações de dextrana e oligossacarídeos após a hidrólise	75

Lista de Figuras

Figura 01:	Esquema do mecanismo de reação de síntese de dextrana proposto por Robyt et al. (1974)	09
Figura 02:	Esquema de síntese de dextrana com ligação α -(1,3) (Robytt & Taniguche, 1976)	09
Figura 03:	Molécula de sacarose e de dextrana	11
Figura 04:	Fluxograma do processo fermentativo convencional para produção de dextrana clínica (López-Munguía, 1983)	15
Figura 05:	Estrutura de Zeólita Y (Giannetto, 1990)	22
Figura 06:	Fluxograma da fase de precipitação da dextrana clínica	30
Figura 07:	Esquema da diafiltração para recuperação de frutose e oligossacarídeos presentes na solução de dextrana nativa	33
Figura 08:	Esquema da separação da frutose em colunas com zeólitas	34
Figura 09:	Varição da atividade enzimática durante a fermentação em batelada alimentada	45
Figura 10:	Hidrólise ácida da dextrana a 72°C e pH 1,0	52
Figura 11:	Hidrólise ácida da dextrana a 76°C a pH1,0	54
Figura 12:	Hidrólise ácida de dextrana a 76°C e pH 1,5	56
Figura 13:	Comparação entre as diferentes condições de hidrólise	56

Figura 14:	Perfil de eluição de frutose e dextrana em coluna com zeólita	67
Figura 15:	Perfil de eluição de dextrana em coluna HILOAD 16/60 com gel Superdex 75	69
Figura 16:	Perfil de eluição de dextrana em coluna HILOAD 16/60 com gel Superdex 200	70

RESUMO

A dextrana é um polissacarídeo de origem bacteriana constituído de unidades monoméricas de glicose, unidas por ligações glicosídicas do tipo α -1,6 na cadeia linear. Este biopolímero possui aplicações na indústria de alimentos, cosméticos e principalmente na indústria farmacêutica. A fração clínica com 75.000 Daltons, tem propriedades de expansor volumétrico de sangue e a de 40.000 Da melhora a fluidez do sangue. Durante a síntese enzimática de dextrana, a partir de sacarose, ocorre a liberação de frutose, um monossacarídeo que deve ser recuperado devido a sua larga utilização na indústria de alimentos. A enzima catalisadora da reação é a dextrana-sacarase, obtida a partir de uma fermentação, em batelada alimentada, com *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512-F. A dextrana clínica é obtida pela hidrólise ácida da dextrana bruta produzida na síntese, e posterior separação por fracionamento com etanol. A frutose é recuperada através de adsorção em zeólitas, aluminossilicatos de desempenho semelhante às resinas de troca iônica, porém de menor custo. Após a recuperação da dextrana clínica e da frutose, o que sobra são oligossacarídeos com peso molecular variando de 1.000 a 20.000 Daltons, que podem ser utilizados como fibras solúveis em diversos tipos de alimentos. Este trabalho teve por objetivo estudar as condições de hidrólise ácida, o fracionamento da dextrana e a separação de frutose por zeólitas. A dextrana foi hidrolisada, aplicando-se temperaturas de 72 a 76°C e pH de 1,0 a 1,5, onde a condição de 76° C e pH1,0 foi a mais eficiente, resultando em uma solução de 30% de dextrana clínica em 4,5 horas de reação. Também foi estudado o processo de fracionamento da dextrana, utilizando-se de 39 e 46% de etanol a 25 e 15°C. Conclui-se que a separação é mais eficiente utilizando-se temperatura de 15°C. Observou-se também que para a obtenção de um produto mais puro, é necessário uma fase de purificação com adição de 44 a 48% de etanol e o uso de colunas cromatográficas. A separação de frutose por ultrafiltro de 1000 Da é eficiente, mas a solução obtida não é pura, encontrando-se outros açúcares na solução permeada. A utilização de zeólitas Ba resultou num fator de seletividade (α) de 2,10 e uma eficiência de separação (ES) de 0,92.

SUMMARY

The dextran is a polysaccharide produced by bacterium and it is formed by monomeric glucose units, with α -1,6 glucosidic bonds at the linear chain. This biopolymer is used by the food industry, cosmetic and mainly for pharmaceuticals issues. The clinical type dextran with molecular weight of 75,000 Da has properties of blood volume expander and the 40,000 Da's one helps on the blood's flow. During the enzymatic synthesis of dextran, from sucrose, occurs also the production of fructose, a monosaccharide that should be recovered because its commercial value. The enzyme responsible for the catalysis of this reaction is the dextransucrase, produced at a fed-batch fermentation with *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512F. The clinical type dextran is obtained by acid hydrolysis of the native dextran, followed by the fractionation with ethanol. The fructose is recovered by diafiltration or adsorption with zeolites, aluminum silicates witch have similar action as ion-change resins, but with lower costs. After the recover of the clinical type dextran and fructose, there is only oligosacharides of molecular weight range from 1,000 to 20,000 Da. This kind of oligosacharides can be used as food fibres and has also cosmetics uses. This work had the objective to study the hydrolysis conditions, the fractionation and the separation of fructose. The native dextran was hydrolysed using high temperatures (from 72 to 76°C) and low pH (from 1.0 to 1.5). The best condition was 76°C and pH 1,0, when it was achieved 30% of clinical type dextran, measured in the solution, after 4.5 hours of reaction. The fractionation was studied using ethanol from 39 to 46%, at 25 and 15°C. It could be noticed that the fractionation was better at 15°C. It is necessary the addition of 44 to 48% of ethanol and the use of chromatographic columns to reach a pure clinical type dextran. The separation of fructose was efficient using ultra filter but if the objective is to obtain pure fructose, the use of another method is necessary. The use of zeolites permitted an separation factor (α) of 2,10, and an efficiency of separation (ES) of 0,92.

1. INTRODUÇÃO

A produção de polissacarídeos ainda é limitada devido à complexidade das estruturas destas moléculas. Mas os progressos da enzimologia tornaram possível a produção de oligossacarídeos através de reações catalisadas por transferases.

A dextrana é um polímero composto de ligações glicosídicas α -(1,6) na cadeia linear e α -(1,2), α -(1,3) e α -(1,4) nas ramificações. Sua estrutura química é altamente dependente do microorganismo produtor da glicosil-transferase. A dextrana mais estudada é a produzida pela enzima extracelular do *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, que contém 95% de ligações α -(1,6).

Como o interesse por produtos de origem microbiana vem aumentando cada vez mais, os biopolímeros têm sido objeto de muito estudo, em especial os oligossacarídeos, por possuírem muitas aplicações industriais, tanto no ramo alimentício, quanto no químico e farmacêutico.

A dextrana de alta massa molecular (dextrana bruta) é utilizada na recuperação secundária do petróleo e em filmes protetores para sementes, entre outros. A de média massa molecular tem grande aplicação na indústria de alimentos e na indústria química.

Com baixa massa molecular, a dextrana encontra sua maior e mais importante aplicação, sendo conhecida como dextrana clínica. Se a massa for da ordem de 75.000 Daltons, é utilizada como expansor volumétrico do sangue, se for de 40.000 Da são aplicadas no auxílio a circulação sanguínea em zonas periféricas.

A dextrana bruta foi obtida através de síntese com enzima purificada, sendo esta última, o produto de uma fermentação cujo caldo fora purificado utilizando-se ultrafiltração e adição de polietilenoglicol. A redução do peso molecular foi realizado via hidrólise ácida e a recuperação das diferentes frações de dextrana foi alcançada pela adição de etanol 95%. Mas além da dextrana ainda tem-se em

solução frutose e oligossacarídeos que podem e devem ser recuperados, tornando o processo mais lucrativo.

A frutose é obtida normalmente a partir do amido de milho, mas é também um produto secundário da conversão de sacarose em dextrana. Ela é um produto de alto valor comercial, estando disponível no mercado em duas formas: líquida (com 42 a 55% de pureza) e cristalina. Além de ser economicamente interessante a recuperação da frutose produzida na síntese de dextrana, também é interessante para o processo, já que a presença de frutose inibe a formação de oligossacarídeos.

A frutose pode ser separada da glicose e da dextrana por adsorção seletiva em zeólitas, aluminossilicatos cristalinos com elementos dos grupos alcalino e alcalino terrosos, com desempenho semelhante às resinas de troca iônica, porém de menor custo.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é estabelecer as melhores condições necessárias para se obter dextrana clínica. Então para isso pode-se dividir o trabalho em três fases:

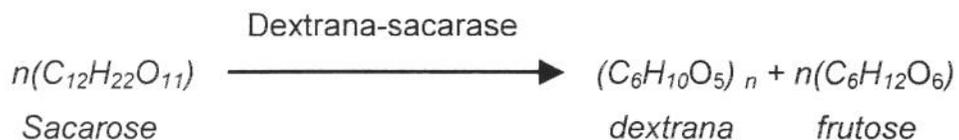
- Obtenção de condições ótimas para a produção de dextrana clínica, através do estudo das condições de hidrólise ácida.
- Estudo do fracionamento da dextrana clínica, utilizando álcool 95%.
- Recuperação da frutose e dos oligossacarídeos

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. DEXTRANA-SACARASE

3.1.1. Propriedades

A dextrana-sacarase [EC 2.4.1.5, α -(1,6)-D-glucana: D-frutose 2-glucosiltransferase] é uma glicosiltransferase que catalisa a transferência de um grupo α -D-glicopiranosil da sacarose para formar a dextrana, liberando uma molécula de frutose, de acordo com a seguinte equação (Jeanes, 1966, citado por Currello, 1993):



Inicialmente a sacarose era o único substrato conhecido que induz a produção da enzima, apesar de vários substratos promoverem o crescimento da bactéria, mas já se sabe que há outros açúcares indutores, porém de baixíssima eficiência (Alsop, 1983).

A estabilidade da enzima é influenciada por vários fatores, sendo verificado que a presença de dextrana, polímeros não aniônicos (polietileno-glicol), metilcelulose, detergentes não aniônicos e cálcio (Ca^{+2}), em solução, aumentam significativamente a estabilidade da dextrana-sacarase (Miller & Robyt, 1986; Kaboli & Reily, 1980).

A adição de cálcio não modifica a atividade enzimática do caldo de fermentação, mas sim a da enzima purificada. Durante o armazenamento, Alsop (1983) observou que a enzima purificada perde atividade rapidamente, mesmo à -15°C sua atividade diminui 60% em 20 dias, mas a adição de 0,05% de cloreto de cálcio provoca um aumento de atividade de 12,6 para 33,9 UDS/ml na enzima

purificada. Isto foi notado também por Mibielli (2001) que verificou um ganho de 64 % no processo de purificação da enzima com adição de cálcio.

3.1.2. Microrganismo

Os trabalhos mais abrangentes desenvolvidos com dextrana foram conduzidos com *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, microrganismo pertencente ao grupo *Streptococceae*, família *Lactobacillaceae* e gênero *Leuconostoc*. As células são esféricas ou lenticulares, com dimensões aproximadas de 0,5 - 0,7 μm por 0,7 - 1,2 μm . É uma bactéria aeróbia facultativa, imóvel, gram positivo, não patogênica e não esporulada, sendo também uma espécie quimiorganotrófica com grande carência nutricional, exigindo meios ricos em vitaminas e aminoácidos, para seu desenvolvimento (Alsop, 1983).

3.1.3. Produção

Tsuchiya *et al.* (1952b), concluíram que um aumento progressivo do nível de sacarose de 0,5 a 5% aumenta o rendimento de enzima, entretanto, para concentrações de sacarose acima de 2%, ocorre um indesejável aumento de viscosidade.

O máximo rendimento de enzima foi obtido em pH 6,7, no entanto ocorre uma perda de 35% da atividade em 1 hora, já que a maior estabilidade da enzima ocorre em pH 5,2.

Como a bactéria produz ácidos no decorrer da fermentação, deve-se manter os níveis de substrato e o pH em 6,7 com adição de álcali (NaOH) e sacarose durante o processo (Alsop, 1983). A perda de atividade, que ocorre no pH de processo, pode ser minimizada cortando-se a alimentação após 6 horas de fermentação (quando atinge-se o máximo de produção), possibilitando a queda de pH até 5,2, melhorando a estabilidade da enzima.

Para uma produção econômica de enzima, é essencial manter um nível baixo de sacarose durante a fermentação (5,0 - 10,0 g/l). Alsop (1983) descreve que em adições de 20 g/l/h de sacarose na fase de crescimento maximizam o rendimento de enzima. Bazán (1993) estudou as condições de fermentação em batelada alimentada, com o objetivo de obter a enzima com a máxima atividade e quantidades mínimas de ART (açúcares redutores totais) no final da fermentação. Alimentando-se o meio com uma solução de 160 g/L de sacarose e NaOH 1N, mantendo-se o pH em 6,7, para uma temperatura de fermentação de 27°C, obteve-se uma atividade enzimática de 106 UDS/mL.

Utilizando uma concentração inicial de 50 g/l de sacarose no meio fermentativo e de 200 g/l de sacarose e NaOH 1N na alimentação Guimarães (1997) obteve atividade enzimática em torno de 100 UDS/ml e observou melhores condições de estabilidade da enzima, para temperatura de fermentação de 27°C.

3.1.4. Cinética enzimática

Martinez-Espindola e Lopez-Munguia (1985) verificaram que a cinética da dextrana-sacarase é descrita pelo modelo de Michaelis-Menten para níveis de sacarose abaixo de 10-15%, para maiores concentrações de sacarose (até 400 g/l), observa-se uma significativa inibição pelo substrato e parâmetros: $K_m = 5,12$ g/l e $K_i = 4,321$ g/l.

Paul et al. (1986) estudaram o comportamento cinético da enzima utilizando maltose como receptor. Foi observado que com a variação da concentração de maltose de 0 a 200 g/L, a velocidade máxima aumentava mais de três vezes. O valor da constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) variou linearmente de 12 a 163 mM com o aumento da concentração do receptor.

3.1.5. Definição de atividade enzimática

Unidade de Dextrana-Sacarase (**UDS**): quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose (solução de 10% sacarose) em dextrana em 1 hora, liberando 0,52 mg de frutose, a 30°C em tampão pH 5,2 (Hehre, citado por Curralero 1993).

Unidade Internacional (**UI** ou **U**) : quantidade de enzima que libera 1 μmol de açúcar redutor por minuto a 30°C e pH 5,2 (Kaboli & Reilly, citados por Curralero, 1993), sendo 1UI equivalente a 20,27 UDS.

3.1.6. Mecanismo de ação catalítica

O mecanismo de ação das enzimas dextrana-sacarases foi muito estudado. Pesquisadores levantaram várias hipóteses, mas mesmo após décadas de estudo, o mecanismo ainda não foi completamente elucidado.

Inicialmente considerava-se 2 hipóteses relacionadas com o crescimento da cadeia de dextrana:

Propagação por múltiplas cadeias: considera que a adição de cada unidade de glicose ocorre separada e aleatoriamente. A enzima se dissocia da cadeia a cada ciclo, ou seja, a cadeia seria formada por várias enzimas.

Propagação por cadeia única: considera que a enzima permanece ligada à cadeia, durante toda a síntese, ocorrendo a dissociação entre cadeia e enzima somente ao término da propagação.

A hipótese de propagação por múltiplas cadeias foi logo descartada porque não foi possível observar a formação de dextranas de baixo peso molecular durante a síntese. Aceitou-se então a hipótese de propagação por cadeia única e a partir daí foram feitas várias pesquisas a fim de elucidar o mecanismo.

Em 1959, estudando sobre a enzima do *L. mesenteroides* NRRL B-512F, Bovey observou que o aumento do peso molecular da dextrana era devido ao aparecimento de ramificações, embora não tenha conseguido identificar e isolar

esses polímeros. Em 1960, Neely propôs que a cadeia se propagaria inicialmente de forma ineficiente, seguido de uma fase rápida de propagação. Mas na presença de aceptores haveria a formação de várias cadeias pequenas, sendo o início bem mais eficiente, enquanto que o crescimento da cadeia, mais lento (Currello, 1993).

Após anos de estudo, também sobre a enzima do *L. mesenteroides* NRRL B-512F, Robyt *et al.* (1974 - 1978), utilizando técnicas de marcadores radioativos e técnica de cromatografia, demonstraram que a dextrana se mantinha ligada à enzima, provavelmente por ligações covalentes e que a dextrana era sintetizada pela extremidade redutora. A partir destas observações, em 1974, sugeriram que a enzima teria dois sítios catalíticos equivalentes, ocorrendo primeiro o ataque à sacarose, e depois ataques nucleofílicos do C₆-OH de um sítio catalítico sobre o C₁ do outro, alternadamente (Figura 01), formando as ligações glicosídicas do tipo α (1,6).

Em 1976, propuseram que a ligação α -(1,3) se dava quando um grupo C₃-OH de uma molécula livre de dextrana atuava como nucleófilo no C₁ do complexo dextranosil-enzima (Figura 02), causando o fim do crescimento da cadeia e o seu conseqüente desprendimento do complexo. Em 1978, observaram que na presença de maltose e sacarose ocorria primeiro a formação de um trissacarídeo, depois um tetrassacarídeo e assim por diante.

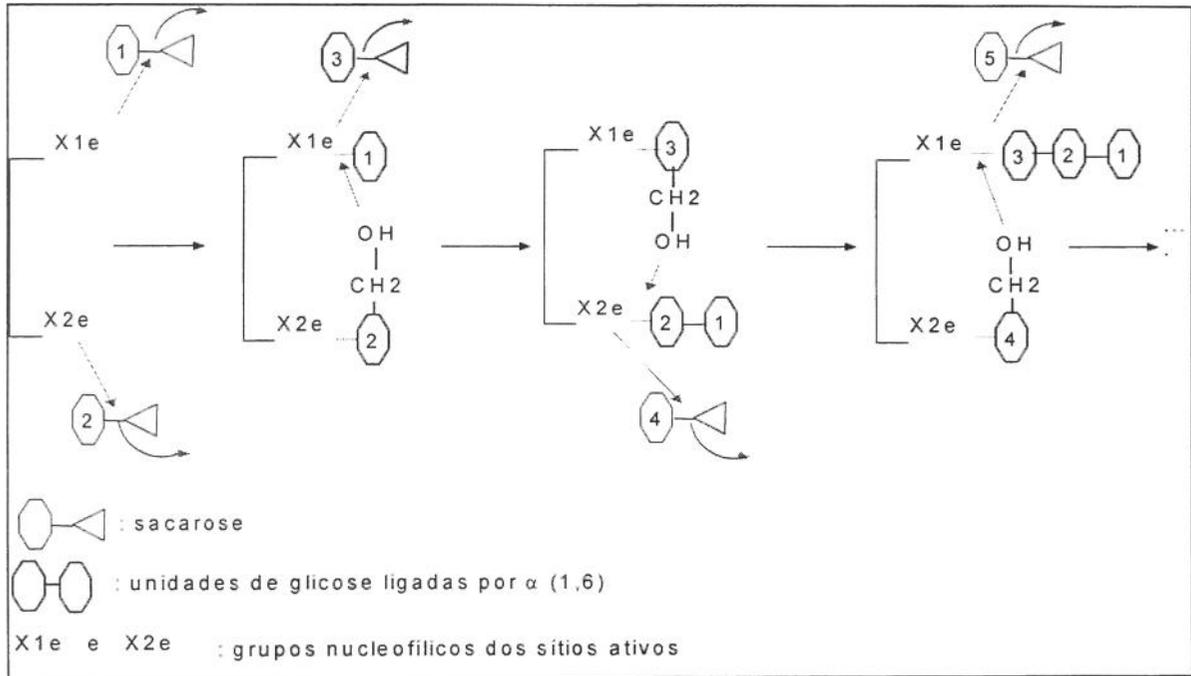


Figura 01: Esquema do mecanismo de reação de síntese de dextrana proposto por Robyt *et al.* (1974)

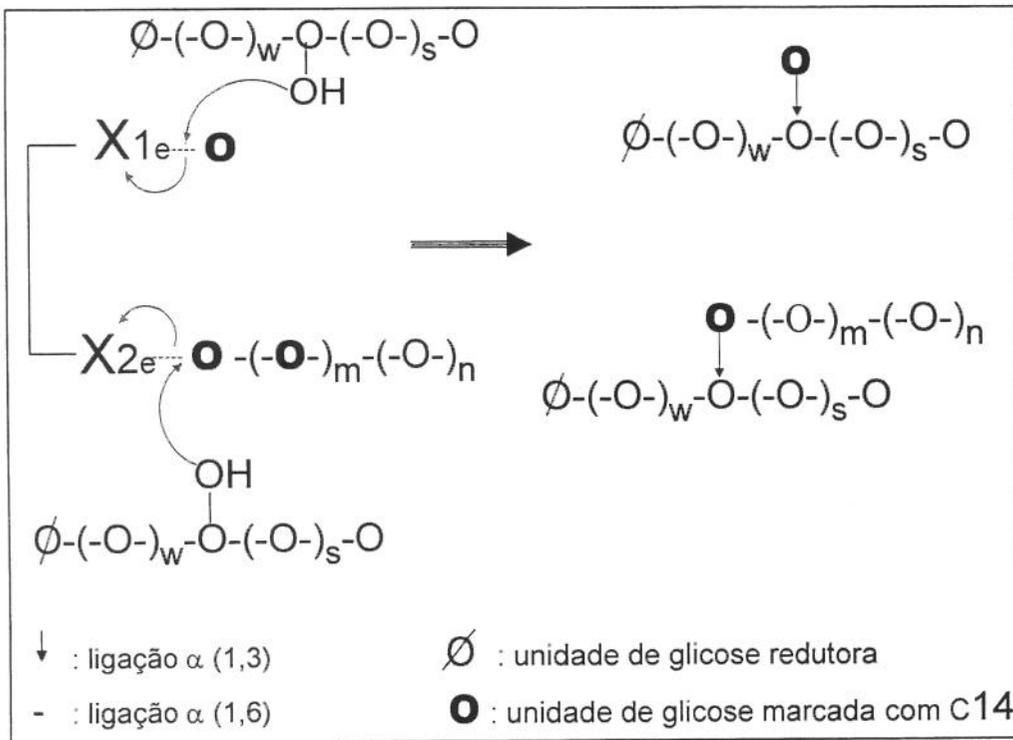


Figura 02: Esquema da síntese de dextrana com ligação α -(1,3) (Robyt & Taniguchi, 1976)

3.2. DEXTRANA

3.2.1. Propriedades

As dextranas são polissacarídeos neutros e quimicamente inertes, compatíveis com a maior parte dos alimentos (Bobbio & Bobbio, 1995). Esses polissacarídeos são produzidos por microorganismos da família Lactobacillaceae, dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e principalmente *Leuconostoc* (Sidebotham, 1974).

Mais recentemente o termo dextrana vem sendo usado para designar uma larga classe de polissacarídeos bacterianos extracelulares, compostos por unidades monoméricas de glicose ligadas predominantemente por ligações α -(1,6) (Alsop, 1983 e Jeanes, 1966). Várias dextranas contêm ramificações nas posições α -(1,2), α -(1,3) e α -(1,4) e outras também podem conter ligações α -(1,3) na cadeia principal (De Belder, 1987). A estrutura molecular da molécula de dextrana e de sacarose é apresentada na Figura 03 e os diferentes tipos de dextranas produzidas por diferentes tipos de microorganismos estão representados na Tabela 01.

Esta diversidade se deve à grande variedade de microorganismos que produzem dextrana, fazendo com que esta não apresente características definidas, sendo suas propriedades e estrutura determinadas pela espécie que a produz (Jeanes, 1966; Lawford et al., 1979).

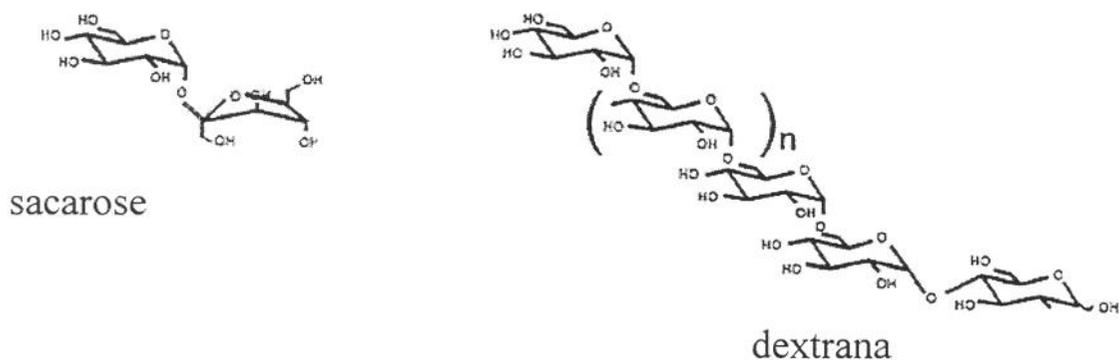


Figura 03 : Molécula de sacarose e de dextrana

A síntese é induzida pela sacarose e não exige cofatores, nem monômeros ativados, como nos mecanismos clássicos de síntese de oligossacarídeos celulares. A energia necessária para a síntese provém da hidrólise da ligação glicosídica da sacarose (López-Munguía *et al.*, 1983).

A dextrana da enzima do *L. mesenteroides* B-512F, constituída por 95% de ligações glicosídicas α -(1,6) e 5% de α -(1,3) em cadeias secundárias curtas (somente 15% é formada por mais de duas unidades), é bastante solúvel em água, metil sulfóxido, etilenoglicol, glicerol e hexametilfosforamida. Em solução aquosa (3 a 10%) apresenta rotação óptica característica em torno de $+200^\circ$, apresentando uma solução clara e bastante estável à esterilização por calor, ao congelamento e ao descongelamento (De Belder, 1987).

Tabela 01: Composição das dextranas produzidas por enzimas procedentes de alguns microorganismos (Sidebothan, 1974; López-Munguía *et al.*, 1983).

Microorganismos	% de resíduos glicosídicos			
	α - (1, 6)	α - (1, 4)	α - (1, 3)	α - (1, 2)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>				
NRRL B-512 F	95	-	5	-
NRRL B-523 S	93	3	4	-
NRRL B-742 S	64	8	28	-
NRRL B-742 L	95	4	-	-
NRRL B-1064	95	2	3	-
NRRL B-1299 L	49	-	19	32
NRRL B-1299 S	56	-	7	36
NRRL B-1355 ^a	85	1	15	-
NRRL B-1355 S	53	-	47	-
NRRL B-1415	87	12	1	-
NRRL B-1416	83	7	10	-
<i>Streptococcus mutans</i>				
OMZ 176	16	-	84	-
Ingbritt A	37	-	63	-
6715 S	64	-	36	-
6715 I	4	-	96	-
Complexo Tibi ^b	90	2	9	-

S Fração solúvel L Fração pouco solúvel I Fração insolúvel

a. Conhecido como *L. dextranicum* b. *Lactobacillus brevis* / *Saccharomyces cerevisiae*

A capacidade de complexar íons metálicos é outra importante propriedade da dextrana e aparentemente está relacionada com os grupos 3-hidroxil das ramificações α -(1,3). Em soluções alcalinas, a dextrana forma complexos com composição definida com muitos íons metálicos, tais como antimônio, cálcio, cobalto, cobre, ferro e urânio (Jeanes, 1966, citado por Curralero, 1993).

Em solução, a dextrana não tem a tendência de adotar uma conformação ordenada, devido à flexibilidade das ligações da cadeia principal. As ramificações dificultam a interação entre as moléculas, tornando a viscosidade intrínseca muito baixa. E até uma concentração de 5% (p/v), a solução de dextrana se comporta como um fluido newtoniano (Jeanes, 1974; Curralero, 1993).

O peso molecular da dextrana depende das condições de síntese tais como: temperatura, pH, concentração de sacarose e concentração de outros açúcares que funcionam como aceptores, reduzindo o peso molecular. (Robyt, 1974).

3.2.2. Aplicações

Somente após a Segunda Guerra Mundial, começou-se a produzir e utilizar os polissacarídeos microbianos. Dentre esses polímeros a dextrana é um dos oligossacarídeos mais estudados, existindo várias patentes registradas apesar de poucas terem alcançado sucesso comercial (Sandford & Barid, 1983; citado por Queiróz, 1987).

As dextranas de alta massa molecular (40 a 50 milhões de Da) têm várias aplicações, como por exemplo, na recuperação secundária do petróleo, em filmes protetores para sementes, no processo de galvanização de metais, entre outros (Alsop, 1983). A dextrana de massa molecular média tem potencial para ser utilizada nas indústrias química (redes moleculares cruzadas e empacotamento de colunas cromatográficas de exclusão molecular) e de alimentos (inibidor de cristalização em sorvetes, homogeneizador e espessante em doces e xaropes) (Santos, 1996).

Com baixa massa molecular (30.000 a 100.000 Da), a dextrana apresenta a sua maior aplicabilidade, principalmente na indústria farmacêutica. Nesta condição, o polímero apresenta duas características importantes: são completamente metabolizadas no organismo e não apresentam efeitos tóxicos ou alérgicos (Currello, 1993). Dentre os usos clínicos destaca-se a dextrana clínica.

No mercado estão disponíveis dois tipos de dextrana clínica (D40 e D75). A dextrana de massa molecular 75.000 ± 25.000 Daltons (D75), comercializada em solução salina a 6% p/v, apresenta propriedades osmóticas e coloidais semelhantes às do plasma. Com estas propriedades é utilizada para manter o volume sangüíneo e a pressão arterial no tratamento de choque ou choque

iminente, como resultado de hemorragia, queimaduras ou cirurgia (De Belder, 1987 e Alsop, 1983). A dextrana com massa molecular 40.000 ± 10.000 Daltons (D40), comercializada em solução salina 10% p/v, melhora a fluidez do sangue, auxiliando a circulação nos vasos capilares (De Belder, 1987).

3.2.3. Produção

Para a produção deste polissacarídeo, a enzima dextrana-sacarase [EC 2.4.1.5, α -(1,6)-D-glucana: D-frutose 2-glicosil transferase] é obtida primeiramente por fermentação bacteriana (*Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F) utilizando-se sacarose como substrato (Alsop, 1983).

Atualmente existem dois processos de produção de dextrana, o processo convencional e o enzimático. Estes dois métodos visam a produção de dextrana de alto peso molecular, sendo necessário, para a obtenção de dextrana clínica, fases de redução de peso molecular, fracionamento e purificação. A Figura 04 é o fluxograma da produção de dextrana clínica pelo processo convencional.

O processo convencional é um método simples, onde somente é feito o controle de temperatura. Neste caso a dextrana é obtida do caldo de fermentação e o processo dura de 18 a 24 horas, obtendo-se um máximo de viscosidade com pH entre 4,5 e 4,8 (Jeanes et al., 1948, citado por Curralero, 1993).

O processo enzimático vem sendo estudado desde 1941, quando Henre produziu dextrana em caldo isento de células. Este processo é dividido em duas fases, sendo a primeira responsável pela produção da enzima dextrana-sacarase via fermentação com *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512F, e a segunda responsável pela síntese "in vitro" da dextrana, pela enzima na sua forma purificada ou bruta.

Dando continuidade aos trabalhos de Guimarães (1997), Mibielli (2001) obteve maiores rendimentos de dextrana bruta com concentração inicial de 50 g/l

e temperatura de 23°C, observando-se ainda que os melhores rendimentos foram obtidos com a enzima purificada.

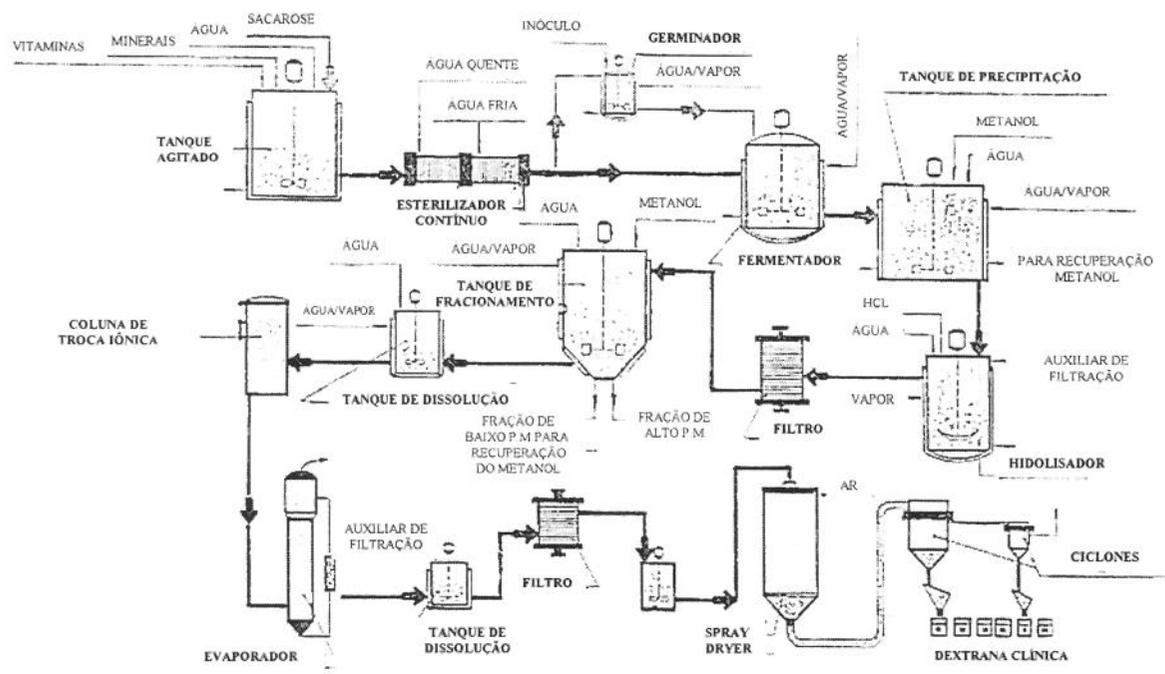


Figura 04: Fluxograma do processo fermentativo convencional para a produção de dextrana clínica (López-Munguía, 1983)

Mibielli (2001) concluiu em seu trabalho que o processo enzimático é muito mais vantajoso que o convencional. Entre as vantagens temos: a simplicidade (no método convencional, a alta viscosidade dificulta a purificação da enzima), maior rendimento (não há consumo de sacarose para o crescimento microbiano durante a segunda fase), e a facilidade de estabelecer melhores condições de controle, estabelecendo-se uma condição ótima para a produção da enzima, e outra para a produção da dextrana (Bazán, 1993; Santos, 1996).

3.2.4. Fatores que afetam o peso molecular da dextrana

Vários fatores podem alterar o peso molecular da dextrana, entre eles podemos citar a temperatura, concentração de sacarose, pH, presença de aceptores e a razão entre aceptores e sacarose.

Em 1983, Alsop utilizando técnicas de permeação em gel (GPC), concluiu que o parâmetro mais importante é a concentração de sacarose, que controla tanto a distribuição do peso molecular, quanto o rendimento.

Com o aumento da concentração de sacarose observou-se um aumento indesejável da concentração de monossacarídeos, principalmente frutose, e de dissacarídeos. A quantidade de dextrana de baixo peso molecular aumenta, principalmente em concentrações acima de 10% de sacarose e conseqüentemente o rendimento de dextrana de alto peso molecular decresce.

Killey et al. (1955), estudando a formação de panose pela ação da dextrana-sacarase na presença de altas concentrações de maltose, verificou que a razão $[maltose]/[sacarose]$ era o fator mais importante para a síntese, seguido da concentração da maltose. Quanto maior a concentração de maltose, menor o peso da dextrana formada.

Mas apesar da reação sofrer influência de diversos outros fatores, o efeito da temperatura, de 4 a 29°C, e da concentração enzimática (4 a 100 UDS/ml) não são significativos, em comparação à concentração de sacarose e razão $[sacarose]/[maltose]$ (Paul et al., 1986).

3.2.5. Redução da massa molecular - Hidrólise ácida

A hidrólise é feita, normalmente, utilizando-se ácido sulfúrico ou clorídrico em temperaturas próximas a 100°C, sendo controlada pela medida da viscosidade (Wolf *et al.*, 1954). As principais vantagens deste método são: facilidade de controle, possibilidade de utilização da dextrana nativa úmida ou não isolada e não exigência de equipamentos sofisticados.

Wolf *et al.* (1954) estudaram a hidrólise ácida parcial da dextrana nativa obtida através da linhagem *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512F, variando o tempo de reação de 10 minutos a 46 horas, temperatura de 70°C a 120°C e pH entre 0,35 e 2,9. Os rendimentos obtidos foram de 47% de dextrana clínica com massa molecular na faixa de 75.000 ± 25.000 a 76°C e pH 1,0, com ácido sulfúrico. Os autores relatam que diferentes dextransas e mesmo preparações diferentes da dextrana produzida pelo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512F podem requerer alguma alteração nos valores obtidos.

Guimarães *et al.* (1999), dando continuidade ao trabalho de Santos (1996) relativo a hidrólise ácida, chegaram a um pH ótimo de 1,0 e temperatura de 72°C, utilizando a metodologia de planejamento experimental, obtendo-se aproximadamente 100% de conversão de dextrana bruta em dextrana clínica. Mibielli (2001) realizou 3 hidrólises, a 72°C e pH 1,0, a 76°C e pH 1,0 e a 76°C e pH 1,5, sendo a terceira a que apresentou melhores resultados. Também foi verificado que até 7 horas de reação, há um aumento progressivo de produção de dextrana clínica e que o ácido sulfúrico interfere nas análises de GPC, mascarando as reais concentrações das dextransas.

Muitos estudos estão sendo realizados com relação à despolimerização enzimática, obtendo-se bons rendimentos e produtos homogêneos, porém sua utilização se restringe a escala laboratorial.

A hidrólise enzimática da dextrana é obtida através da enzima dextranase. Esta enzima é produzida por cultura de várias espécies de bactérias aeróbias,

Penicillium e *Aspergillus*. Uma seleção de enzimas disponíveis comercialmente produziram distribuições de massa molecular diferentes a partir do mesmo material, devido aos diferentes mecanismos de ação (Alsop, 1983).

3.2.6. Fracionamento

Convencionalmente, dextranas que apresentam distribuição da massa molecular específicas, são fracionadas após a hidrólise por precipitação repetitiva com solvente. A distribuição da massa molecular pode ser rapidamente verificada por cromatografia de permeação em gel. Com isso, a hidrólise pode ser finalizada quando o resultado mostrar a máxima porcentagem de moléculas na faixa de massa molecular desejada (Alsop, 1983).

Independente do processo utilizado para a redução do grau de polimerização, esta etapa se faz necessária, pois a partir do fracionamento, consegue-se o isolamento das frações de interesse. Isto pode ser feito explorando as diferentes solubilidades das moléculas de dextrana de diferentes tamanhos. Tal fracionamento pode ser feito pela precipitação da dextrana com variações nas concentrações de solventes orgânicos, normalmente álcoois ou acetonas.

Wolf *et al.* (1954) em seus estudos utilizaram etanol 95% em concentrações de 39 a 46%, e conseguiram 47% de rendimento de dextrana clínica. Com o uso de metanol (42 a 49%), o rendimento ficou um pouco inferior, em torno de 43%, considerando-se a temperatura ideal para esta etapa em torno de 25°C. Mas Mibielli (2001), apesar de ter estudado uma faixa de concentração de etanol de 33,25 a 46%, não obteve bons resultados para precipitação e purificação da dextrana.

Há outras formas de fracionamento como: ultrafiltração (Baker, 1969), cromatografia de permeação em gel em batelada (Granath & Flodin, 1961), semicontínua (Barker & Vlachogianis, 1983) e contínua (Barker, Ganetsos e England, 1989). As principais desvantagens desses processos são o alto custo

dos equipamentos envolvidos e a curta vida útil das membranas e resinas (Currello, 1993).

3.3. FRUTOSE

3.3.1. Aspectos gerais

A frutose é um monossacarídeo, que no estado cristalino, encontra-se na forma β -D-frutopiranoose, sendo encontrada em plantas, animais e principalmente em frutas, onde pode estar presente na forma livre ou combinada (dissacarídeos ou polissacarídeos). Quando dissolvida em água a frutose resulta em uma mistura complexa de isômeros em equilíbrio, como α -D-frutopiranoose, β -D-frutopiranoose, α -D-frutofuranose e β -D-frutofuranose, resultado de uma rápida interconversão piranoose-furanose (Pawan, 1973).

O principal produto comercial contendo frutose é um xarope (high-fructose syrups, HFS) composto por 42 a 55% de frutose, desenvolvido na década de 60 com os avanços tecnológicos nas áreas de refinação, isomerização e separação. Entretanto a comercialização de frutose cristalina surgiu somente na década de 80, devido ao desenvolvimento da tecnologia de cristalização (Silva, 1998).

O mecanismo de absorção da frutose pelo organismo humano depende da maneira como o monossacarídeo se encontra. Atualmente não há evidências que a absorção ocorra por transporte ativo em humanos, e por isso aceita-se a hipótese de que a frutose é absorvida pela mucosa intestinal de humanos por difusão facilitada, ou seja, absorção facilitada na presença de glicose (Ruby et al., 1993).

3.3.2. Propriedades

Sua principal propriedade é a doçura relativa de 117 em uma escala onde a doçura da sacarose é fixada em 100. Outras propriedades importantes são: a alta solubilidade em água (80% a 20°C) e a alta higroscopicidade, o que a torna útil como inibidor de cristalização no armazenamento de alimentos (Cândido & Campos, 1996; Hanover & White, 1993).

A sinergia apresentada pela frutose com outros açúcares presentes no sistema e também com adoçantes como aspartame, sacarina e sucralose, possibilita a obtenção de produtos alimentares com maior doçura e menor custo, devido a redução da quantidade de adoçante utilizado (Cândido & Campos, 1996).

A frutose reduz a atividade de água em alimentos, possibilitando uma maior estabilidade aos microrganismos sem que haja remoção de umidade, necessária à textura dos mesmos. Em concentrações iguais, soluções de frutose apresentam menor atividade de água do que soluções de açúcares com massas moleculares mais elevadas. A alta solubilidade da frutose dificulta sua cristalização em sistemas onde está muito concentrada, favorecendo a retenção da umidade do alimento por um período maior, melhorando a qualidade, textura e vida de prateleira (Hanover & White, 1993).

3.3.3. Aplicações

A indústria de refrigerantes (bebidas carbonatadas) e a de panificação, são as principais usuárias do HFS, pois além de econômico, é de fácil manuseio e proporciona uma doçura aproximadamente igual à sacarose (Hanover & White, 1993).

Com o avanço das tecnologias de cristalização, atualmente a comercialização da frutose na forma cristalina é feita em larga escala e a custos menores. Por isso, houve um aumento significativo em sua utilização nas

indústrias alimentícias, principalmente nas de produtos como cereais matinais, cereais em barra, bebidas energéticas para esportistas, pó para sucos, iogurtes, leite achocolatado, entre outros (Hanover & White, 1993).

3.3.4. Produção

O amido de milho é a principal matéria-prima para a produção do HFS devido ao seu baixo custo em muitos países, mas no processo de síntese "*in vitro*" de dextrana, também se produz a frutose, como produto secundário. Esta é liberada ao meio quando a enzima dextrana-sacarase cliva a molécula de sacarose e polimeriza o polissacarídeo, e podendo ser separada logo após a síntese da dextrana.

3.4. Zeólitas

3.4.1. Generalidades

As zeólitas são aluminossilicatos cristalinos com estrutura tridimensional microporosa. Os elementos estruturais básicos são os tetraedros $AlSO_4$ ou $SiSO_4$, onde os átomos Al ou Si, se localizam no centro e os átomos de oxigênio nos vértices dos tetraedros, que são unidos por compartilhamento dos átomos de oxigênio (Breck, 1974).

O interesse na sua aplicação é devido a algumas propriedades: microporosidade com dimensão do poro uniforme, seletividade de adsorção por tamanho molecular, propriedades de troca iônica, estabilidade térmica e facilidade de regeneração.

Os tetraedros $(AlSO_4)^-$ induzem à formação de cargas negativas na estrutura zeolítica, e esta carga é contra-balanceada por um cátion de compensação, que se localiza nas cavidades sem pertencer à estrutura cristalina. Este cátion de

compensação atribui diversas propriedades à zeólita. A troca com alcalinos terrosos e terras raras aumenta a resistência da zeólita, sua vida útil e atividade catalítica (Breck, 1974).

A célula unitária cúbica da zeólita X e Y, têm estrutura similares, caracterizada por oito octaedros truncados conectados por 16 prismas hexagonais, formando assim uma grande cavidade com aproximadamente 13,7 Å de diâmetro livre (super-cavidade). As diferenças são observadas quanto à composição e distribuição do cátion, relação Si/Al e ordenação de Si e Al nos tetraedros.

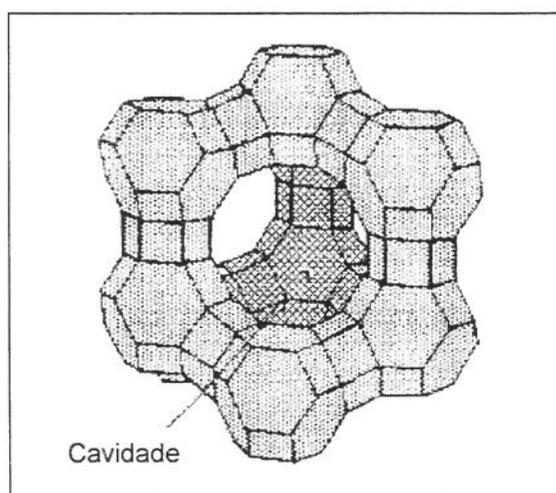


Figura 05: : Estrutura da Zeólita Y (Giannetto, 1990)

3.4.2. Separação da frutose

Após a síntese da dextrana, obtém-se uma solução contendo sacarose, leucrose, frutose e oligossacarídeos. O grande valor comercial atribuído à frutose, torna de grande interesse sua separação.

Barker & Ganetsos (1985) utilizaram um cromatógrafo semicontínuo com coluna empacotada com resina na forma cálcica, onde a frutose é adsorvida na coluna formando um complexo químico com os íons cálcio. No eluente,

concentram-se a glicose, maltose e os oligossacarídeos. Em seus resultados os autores obtiveram produtos com altas purezas, onde havia no mínimo 90% de frutose.

Ho, Ching e Ruthven (1987) fizeram um estudo comparativo entre zeólitas CaX (Si/Al=2,2) e CaY (Si/Al=1,3) e duas resinas adsorventes (Ca⁺²Zerolit 225SRC14 e Ca⁺²Duolite C-214) para a separação de frutose em solução composta de frutose e glicose. Foi observado que a CaX não apresenta seletividade para frutose nas condições estudadas e que a zeólita CaY apresenta seletividade comparável à da resina Duolite. A resina Zerolit apresentou a maior seletividade, mas a zeólita CaY tem a vantagem de oferecer mínima resistência à transferência de massa. Observaram também que para altas concentrações, é necessário utilizar temperaturas de processo elevadas, entretanto em temperaturas maiores que 65°C ocorre redução da qualidade do produto.

Cheng & Lee (1992) estudaram a separação da mistura glicose-frutose em colunas de leito fixo com zeólitas Y, obtendo melhores resultados com zeólitas contendo cátions de bário e cálcio (Ba-Y e Ca-Y), temperatura de 40°C, baixas vazões de dessorvente e menores razões de quantidade de mistura injetada por vazão de dessorção.

Em estudos recentes, Silva (1998) realizou planejamentos experimentais alcançando melhores resultados de adsorção utilizando zeólitas Y com relação de Silício/Alumínio de 2,59 e cálcio (Ca⁺⁺) como cátion trocado durante 24 horas. No teste de adsorção de frutose em meio contendo dextrana, obteve-se uma relação de 30 mg de frutose adsorvida por 1 grama de zeólita.

Neuzil et al. (United States Patents, 1984) patentearam um processo para separação de glicose de frutose. Para isso estudaram a seletividade das zeólitas A, X e Y em uma coluna de 70 cc a 55°C, 50 psig e usando água como eluente, operada em forma de pulso e observaram que as zeólitas KY, BaX, Ba-SrX e SrX são as mais seletivas para frutose em relação à glicose.

Burkert (2001) em seu estudo (em andamento) obteve bons resultados para a separação da frutose de meios contendo dextrana, utilizando zeólita Ba^{+2} em coluna de leito fixo a 40°C, utilizando água como eluente. A eluição de frutose e glicose resultou em uma eficiência de separação (ES) de 1,94 e um fator de seletividade (α) de 2,24, a eluição de frutose e dextrana (padrão de 515.000 Da) resultou numa eficiência de separação de 0,61, enquanto que a eluição de frutose e dextrana 9.300 Da resultou numa ES de 1,47.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DE DEXTRANA NATIVA

4.1.1 Produção da enzima dextrana-sacarase

- *Microorganismo*

Na realização das fermentações para a produção da enzima dextrana-sacarase foi utilizado o microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512-F, fornecido pelo National Center for Agricultural Utilization Research (Agricultural Research Service – USDA).

- *Meio de cultura*

Foi utilizado o meio padrão, otimizado por Guimarães (1997), na fermentação.

Tabela 02: Composição do meio padrão (Guimarães, 1997)

Reagente	Concentração (g/l)
Açúcar cristal comercial	50
Extrato de levedura	20
Fosfato de potássio dibásico	20
Sulfato de magnésio	0,2
Sulfato de manganês	0,01
Sulfato ferroso	0,01
Cloreto de cálcio	0,02
Cloreto de sódio	0,01

Devem ser preparadas duas soluções, uma de sacarose e extrato de levedura dissolvida em solução salina e outra de fosfato de potássio dibásico. Após ajustar o pH para 6,7 com HCl ou NaOH, ambas soluções são esterilizadas separadamente a 121°C por 15 min, e misturadas somente depois de frias para evitar a precipitação durante a esterilização (Santos, 1996).

- *Etapas da fermentação*

- a) Ativação do microorganismo

Esta etapa se torna essencial quando o microorganismo se encontra há muito tempo congelado (-15°C) sem sofrer ativação. Inocula-se um tubo de cultura estoque do microorganismo em 100 ml de meio padrão previamente esterilizado em um erlenmeyer de 500 ml sem aletas. A incubação é realizada em shaker rotatório a 27°C e 150 rpm. De 6 em 6 horas repica-se 10% de inóculo em novo meio de cultura, até a atividade enzimática atingir 20 UDS/ml. Após a ativação o microorganismo é congelado em solução de glicerol 10%.

- b) Inóculo

O inóculo é preparado, em erlenmeyer de 500 ml, contendo 150 ml de meio padrão, inoculado com um tubo de cultura estoque do microorganismo previamente ativado e colocado em shaker rotatório a 27°C e 150 rpm por 6 horas.

- c) Alimentação

A solução de alimentação tem concentração de 200 g/l de sacarose e 40 g/l de hidróxido de sódio. As soluções devem ser esterilizadas separadamente e misturadas logo após esfriarem (Guimarães, 1997).

d) Fermentação

Em um fermentador BIOFLOW 3000 da New Brunswick Scientific Co. de 5,0 l de capacidade contendo 3,5 l de meio padrão estéril, é adicionado 10% de inóculo. A fermentação ocorre a 27°C, com aeração de 0,5 l/min e agitação mecânica de 150 rpm. O pH é mantido em $6,7 \pm 0,1$ com adição de solução combinada de sacarose e NaOH, adicionada ao meio de cultura através de uma bomba peristáltica comandada pelo controlador automático de pH durante um período de 6 horas. Após esse tempo, a alimentação é interrompida e a fermentação é encerrada quando o pH atingir 5,2, num tempo máximo de 8,5 horas de processo (Guimarães, 1997).

e) Separação das células:

O caldo proveniente da fermentação é centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a uma temperatura de 4°C em centrífuga SORVALL modelo RC-5C, para separação das células bacterianas.

f) Purificação da enzima:

Para a purificação da enzima realiza-se uma ultrafiltração em ultrafiltro SARTORIUS modelo SM 16525, eliminando moléculas menores de 20.000 Da, até se obter um volume de concentrado igual à metade do volume inicial. Mantendo-se o caldo concentrado em banho de gelo, adiciona-se lentamente no concentrado uma solução 50% de polietileno-glicol 1500 (PEG 1500), também resfriado, de mesmo volume e centrifuga-se a mistura a 12.000 rpm e temperatura de 4°C durante 10 minutos. A fase rica em dextrana-sacarase (precipitado) é rediluída em tampão acetato de sódio 20 mM com pH ajustado em 5,2, contendo 0,05 g/l de cloreto de cálcio. A enzima purificada é estocada a -15°C.

4.1.2 Síntese de Dextrana

As reações de polimerização serão realizadas em reator de vidro encamisado (1000 ml), equipado com um agitador mecânico por 2,5 horas. O controle de temperatura é feito por circulação de água através do reator, obtida de um banho externo termostaticado mantido a temperatura de 23°C e o pH é mantido em 5,2 através do uso de tampão fosfato. A concentração inicial de sacarose é de 50 g/l, e a concentração enzimática de 40 UDS/ml (Mibielli, 2001). A dextrana deve ser estocada a -15°C. Também foi realizado um estudo com atividade enzimática de 160 UDS/ml.

Retiram-se amostras a cada 30 minutos para a determinação das concentrações de frutose, glicose, sacarose, oligossacarídeos e dextrana formada, bem como a distribuição da massa molecular das dextranas, realizada em HPLC pelo método de cromatografia de permeação em gel, após inativação da enzima em banho maria por 10 minutos.

4.2 OBTENÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA

4.2.1 Hidrólise ácida

Os experimentos foram realizados em balão de três bocas de 250 ml, contendo 100 g de dextrana bruta (proveniente da síntese). O balão de reação deve ser imerso em um banho termostaticado para a manutenção da temperatura, e equipado com condensador, agitador mecânico e termômetro. Adiciona-se ácido sulfúrico 3 N na amostra em quantidade apropriada para propiciar o pH desejado. O ácido é adicionado rapidamente com a agitação mecânica ligada e o tempo de hidrólise cronometrado a partir do instante da adição do ácido.

Tabela 03: Condições experimentais para hidrólise ácida

Experimento	Temperatura	pH
1	72°C	1,00
2	76°C	1,00
3	76°C	1,50

Retiram-se amostras de 30 em 30 minutos, durante todo o tempo de reação (10 horas). O processo é interrompido através de resfriamento rápido em banho de gelo, e simultânea neutralização com solução de hidróxido de sódio 1,5 N. A neutralização final para pH 6,5 a 7,0, ocorre na temperatura ambiente com solução alcalina mais diluída. As amostras foram dialisadas, utilizando uma membrana permeável a moléculas de até 14.000 Da, para a retirada dos sais formados, que interferem nas análises em GPC, e congeladas para posterior análise de distribuição da massa molecular.

Depois da determinação da condição e tempo ideal para a obtenção de maior rendimento de dextrana clínica, passou-se a realizar a hidrólise em balões de três bocas de 500 ml, equipados como o balão descrito anteriormente. Neste caso a retirada dos sais foi realizada por diafiltração em ultrafiltro Millipore (Prep/scale – TFF) capaz de separar as moléculas menores de 1.000 Da das demais.

4.2.2 Precipitação

A precipitação (fracionamento) é realizada segundo metodologia de Wolf *et al.* (1954), adicionando-se, lentamente (4 ml/min), etanol 95% em quantidades adequadas para atingir as concentrações desejadas na solução de dextrana hidrolisada, contendo no máximo 5% de dextrana. Após a adição do etanol, coloca-se as amostras em tubos de centrifuga que são mantidos em banho termostatizado com temperatura controlada por 1 hora. A dextrana é separada por centrifugação a 12.000 rpm por 12 minutos em centrífuga SORVALL modelo RC-

5C, com temperatura controlada. Esta etapa foi realizada a 25°C e 15°C, podendo-se analisar o efeito da temperatura na precipitação da dextrana.

Foram realizados estudos de fracionamento para descobrir os melhores percentuais de etanol na solução para aumentar o rendimento de dextrana clínica precipitada. Devendo-se analisar a distribuição da massa molecular, tanto no sobrenadante quanto no precipitado (rediluído).

4.2.3. Fração clínica

A fração clínica da dextrana foi obtida através da precipitação seletiva utilizando diversas concentrações de etanol. O Fluxograma (Figura 06) mostra como foi obtida a fração clínica de dextrana, onde a fração B-1 é a fração clínica, que deve ter entre 30.000 e 100.00 Da.

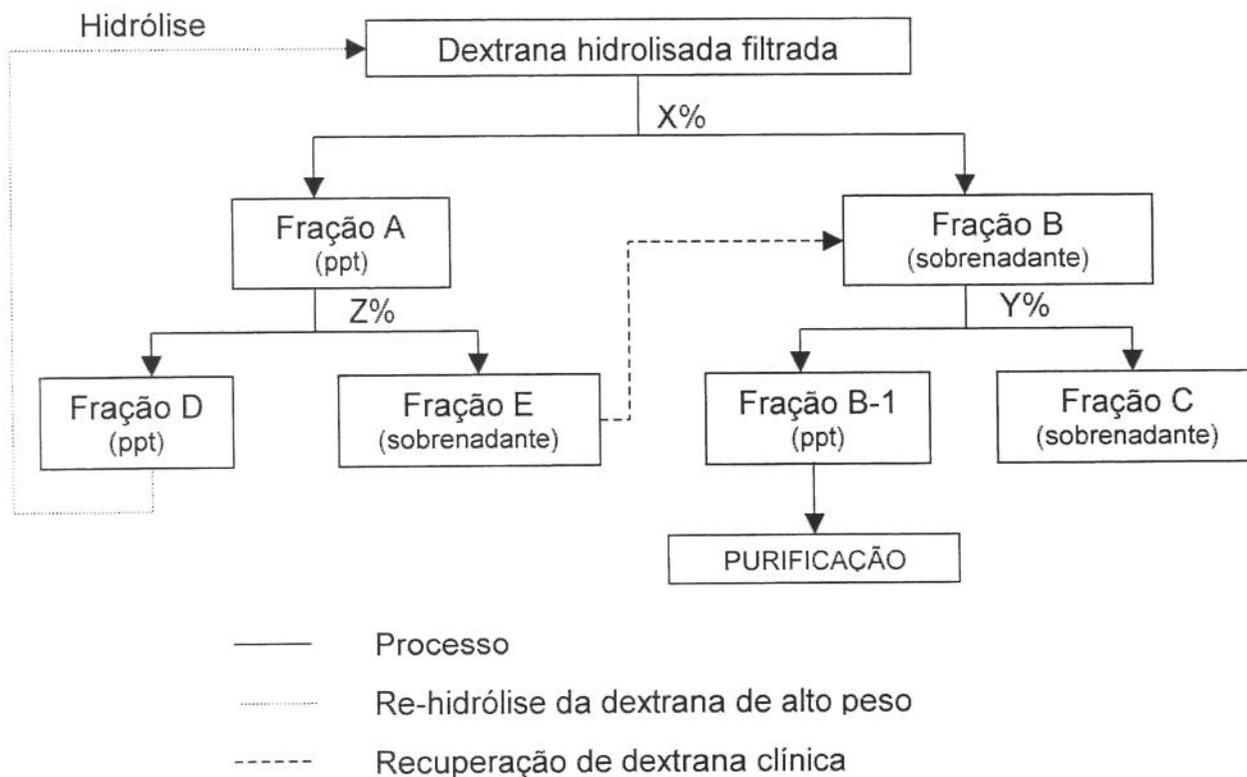


Figura 06: Fluxograma da fase de precipitação de dextrana clínica

A sequência de fracionamento é a seguinte: primeiro adiciona-se à dextrana hidrolisada etanol 95%, até concentração final de X%, para a precipitação da dextrana de alto peso molecular (PM > 100.000 Da), equivalente à fração A. A fração B (sobrenadante), rica em dextrana clínica e em dextrana de baixo peso molecular, sofre a adição de mais etanol 95% até atingir Y% de etanol, para que ocorra a precipitação da fração clínica (B-1). A fração C (sobrenadante) é composta principalmente por oligossacarídeos de peso molecular menor que 30.000 Da.

A fração A, por sua vez foi novamente rediluída a 5% para a adição de etanol 95% até concentração final de Z% de etanol, para a recuperação da dextrana clínica que eventualmente é arrastada pela dextrana de alto peso molecular. O precipitado desta fase (D) seria re-hidrolisado para futuro fracionamento, e o sobrenadante (E) sofreria o mesmo processo que a fração B.

Por fim, a fração B-1, composta de dextrana clínica, é rediluída a 5% e passaria por mais uma fase de fracionamento, adicionando-se a quantidade de álcool necessária para a obtenção de uma dextrana clínica, dentro dos padrões exigidos.

O primeiro fracionamento foi realizado, baseando-se no trabalho de Mibielli (2001) e seguindo-se a Tabela 04.

Tabela 04 : Porcentagens de etanol adicionadas no fracionamento

X%	Y%
39	43
39	46
39,5	45,5

No estudo do Z%, variou-se a porcentagem de etanol de 29 a 41%, seguindo-se a seguinte ordem mostrada na Tabela 05.



Tabela 05: Porcentagens de etanol adicionadas no estudo de Z%

X%	Y%	Z%
39	43	29 a 35,4
39	46	37 a 41

A 15°C foi realizado experimentos seguindo a Tabela 06.

Tabela 06: Porcentagens de etanol adicionadas no fracionamento a 15°C

X%	Y%
38	42,2
38,5	42,7
39	45,1
39	45
39	45,5
39	46

No trabalho de Wolf et al. (1954) observa-se uma etapa de purificação da fração clínica, adicionando-se a esta fração, rediluída a 5% de dextrana, X e Y% de etanol. Em trabalhos anteriores, foi observado que a adição da mesma porcentagem de etanol utilizado na obtenção de dextrana clínica não resulta na precipitação da mesma fração na precipitação, então realizou-se um quarto fracionamento, onde foi estudada a purificação da fração clínica utilizando-se de 35 a 48% de etanol.

Por último estudou-se a separação da dextrana de 75.000 ± 25.000 Da e da dextrana de 40.000 ± 10.000 Da, estando ambas presentes na fração clínica. Para isso adicionou-se na dextrana clinica, rediluída a 5%, 37 a 48% de etanol.

4.3 RECUPERAÇÃO DA FRUTOSE

4.3.1. Ultrafiltração

Fez-se uso de um ultrafiltro de 1.000 Da de capacidade de separação, para retirar a frutose da solução. Esta diafiltração foi realizada segundo esquema representado pela Figura 07.

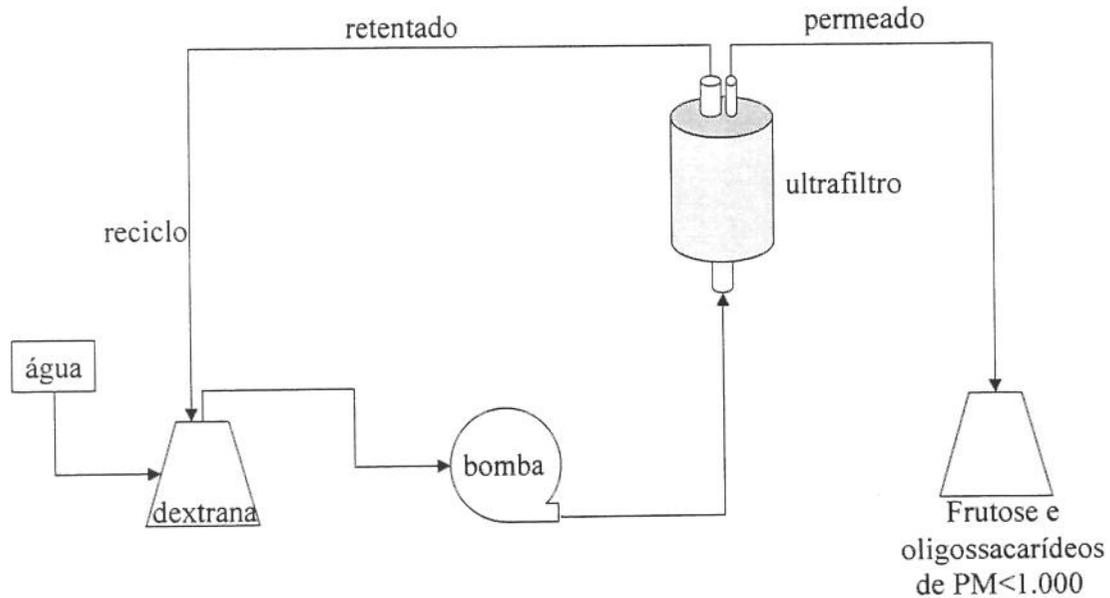


Figura 07: Esquema da diafiltração para a recuperação de frutose e oligossacarídeos presentes na dextrana nativa

4.3.2. Coluna de separação com zeólitas BaY

A separação da frutose da solução contendo frutose, oligossacarídeos e dextrana, foi realizada por adsorção em zeólitas BaY em coluna Pharmacia C10/40 encamisada, com 1 cm de diâmetro e 25 cm de altura de leito a 40°C. A zeólita possui tamanho de partícula entre 0,053 e 0,125 mm. A coluna foi operada na forma de pulso, com eluição de 2 ml da amostra contendo dextrana, oligossacarídeos e frutose, tendo como eluente água deionizada (Milli-Q) na vazão de 0,1 ml/ min. Amostras foram coletadas na saída da coluna por coletor

automático e os açúcares analisados por cromatografia líquida. A Figura 08 representa o sistema descrito acima.

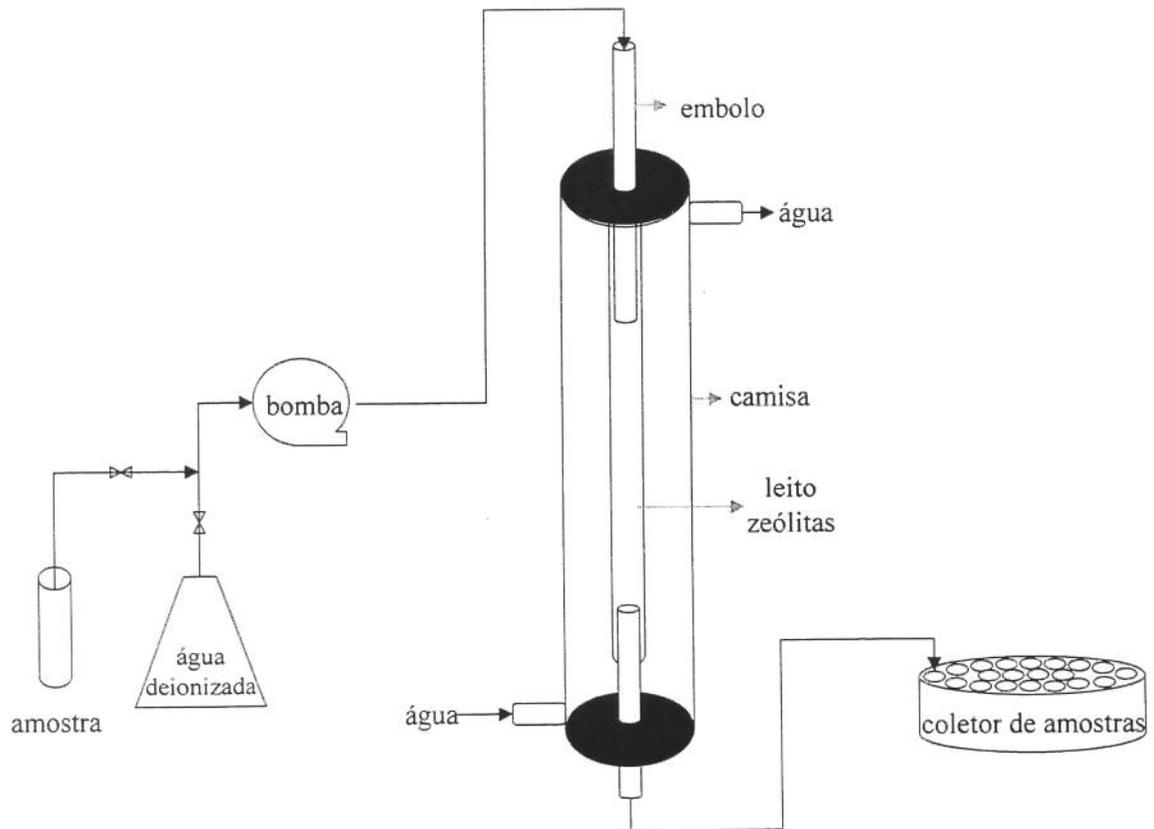


Figura 08: Esquema da separação de frutose em coluna com zeólitas

A eficiência de separação (ES) entre frutose (1) e a dextrana (2) produzida, é calculada conforme a equação abaixo:

$$ES_{12} = \frac{\Delta t_{12}}{\sigma_{12}}$$

Definindo-se:

$$\Delta t_{12} = |\mu_1 - \mu_2|$$

$$\sigma_{12} = (\sigma_1 \cdot \sigma_2)^{1/2}$$

Onde:

$$\mu_j = \frac{\sum_{i=1}^n c_i \cdot t_i \cdot \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n c_i \cdot \Delta t_i} \quad \text{e} \quad \sigma_j^2 = \frac{\sum_{i=1}^n c_i \cdot (t_i - \mu_j)^2 \cdot \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n c_i \cdot \Delta t_i}$$

Onde: c_i = concentração do componente na fração de tempo i

t_i = tempo de retirada da amostra

Δt_i = intervalo da amostragem

Outra forma de determinar a eficiência da separação é o cálculo do fator de seletividade (α) que pode ser definido como a relação entre os parâmetros de equilíbrio da frutose e da dextrana. O tempo de retenção médio em um sistema linear está relacionado ao parâmetro de equilíbrio K (Ho et al., 1987).

$$\bar{t} = \frac{L}{v} \left[1 + \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) K_i \right]$$

onde: L = comprimento da coluna

$$v = \frac{\text{vazão}}{A \cdot \varepsilon} \quad (\text{velocidade intersticial})$$

ε = porosidade

\bar{t} = tempo de retenção médio (μ_j)

Sendo: $\alpha = \frac{K_1}{K_2}$

4.4. SISTEMA DE RECUPERAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS E DEXTRANAS EM FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Utilizou-se para a separação dos oligossacarídeos de peso molecular menor que 30.000 Da e para a purificação de dextrana D75 e D40, colunas HILOAD 16/60 da Pharmacia Biotech, com diâmetro interno de 16 mm e altura de leito empacotado de 60 cm. Foram utilizadas duas colunas, uma com leito empacotado com gel Superdex 75 e outra com gel Superdex 200. As características das colunas podem ser observadas na Tabela 07.

Tabela 07: Características das colunas HILOAD 16/60

Propriedade	Superdex 75	Superdex 200
Fracionamento (Da)	3.000 – 70.000 (proteínas globulares) 500- 30.000 (dextrana)	10.000 – 600.000 (proteínas globulares) 1.000 – 100.000 (dextrana)
Matriz	Partículas esféricas formadas por ligações cruzadas entre agarose e dextrana	
Tamanho médio de partícula	34 µm	
Estabilidade química	Estável em todos tampões comumente utilizados: 1M ác. Acético, 8M uréia, 1M hidrocloreto de guanidina, 30% isopropanol, 70% etanol, 1M NaOH	
Estabilidade pH	3-12 (longo uso)	
Volume coluna	120 ml	
Volume amostra	≤ 5 ml	
Pressão máxima	3 bar	
Nº pratos teóricos	> 13.000 (m) ⁻¹	
Fluxo	0,3 – 1,7 ml	

Foram também necessários: coletor de frações automático (FRAC 100), loop de injeção (2ml), bomba de alta precisão (P-500), software FPLC Director 1.10, detector UV (Uvicord SII), controlador de cromatografia líquida (LCC-501 Plus), todos da Pharmacia Biotech.

Como eluente foi utilizada água deionizada (Milli-Q) e a separação foi realizada numa vazão de 1ml/min em temperatura ambiente.

A amostra foi diluída em água deionizada (Milli-Q) para a obtenção de uma concentração que torne possível a leitura da dextrana em UV, com intensidade de absorção de 206 nm.

Permitiu-se a circulação do eluente na coluna e somente após estabilização da vazão é que as amostras (2ml) foram injetadas por intermédio de um loop. Após 4 minutos, o coletor de amostras foi acionado para a coleção de amostras de 5 ml, por um tempo de 180 minutos.

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1 Determinação da massa molecular de dextrana (GPC)

- *Equipamento*

Para a determinação da massa molecular de dextrana, bem como sua distribuição molecular, foi utilizada a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), composta de diversos equipamentos:

- Um injetor automático VARIAN 9095;
- Uma bomba ternária VARIAN 9010;
- Um forno Spark Holland 99;
- Um detector de índice de refração R14;

- Um software para aquisição, processamento dos dados e geração de relatórios ("Millennium Chromatography Manager v2.1 0" - Waters);
- Um conjunto de três colunas e uma pré-coluna VARIAN série Micropak. As colunas foram conectadas em série na seqüência de poro decrescente.

Tabela 08: Características das colunas utilizadas para determinação da distribuição percentual da massa molecular da dextrana

Colunas TSK - Gel	Faixa de Exclusão	Comprimento (cm)	Diâmetro (cm)
G 3000 PW	1 X 104	30	0,75
G 4000 PW	3 x 105	30	0,75
G 6000 PW	1 X 107	30	0,75
Pré-coluna	-	7,5	0,75

- *Curva de calibração*

Utilizam-se padrões de dextrana (American Polymer Standards Corporation) na curva padrão, utilizando M_w , M_n e M_p como parâmetros básicos.

Tabela 09: Massas moleculares dos padrões de dextrana utilizados para fazer a curva padrão.

Padrão	M_w	M_n	M_p
DXT 11K	11.700	9.900	8.000
DXT 43K	42.750	35.000	28.700
DXT 79K	78.800	68.000	49.400
DXT 165K	165.500	150.000	110.800
DXT 685K	685.000	500.000	380.600
DXT 1750K	1.750.000	1.450.000	1.250.000
DXT 5000K	4.900.000	4.500.000	1.500.000

- *Quantificação das amostras*

Quantifica-se as amostras a partir da integração dos cromatogramas com o auxílio do software, "Millennium v2.10", e obtém-se a distribuição da massa molecular das amostras através da curva de calibração.

- *Preparo da Fase Móvel*

O principal critério para análise de polímeros por cromatografia de permeação em gel é a sua solubilidade em água. Como eluente foi utilizado água ultrapura, obtida de um sistema de purificação compacto Milli-Q Plus. A água foi degaseificada durante uma hora num banho ultra-som Eurosonics, modelo SX-20. O frasco contendo a fase móvel foi mantido de 10 a 15 cm acima da entrada da bomba, sendo seu fluxo aumentado lentamente até 1,0 ml/min.

- *Preparo das Amostras e Padrões*

As amostras e os padrões de dextrana foram dissolvidos em água Milli-Q numa concentração de 0,4% (p/v) e colocados em tubos apropriados do equipamento sem filtragem, devido as amostras serem muito viscosas.

Posteriormente foram deixadas em repouso por um período de 16 a 20 horas antes de serem injetadas. Este tempo é necessário para permitir que a cadeia do polímero se estenda para sua conformação de solvatação no solvente, principalmente para amostras e padrões com massa molecular acima de 200.000 Da.

4.5.2 Determinação de açúcares

a) Determinação de açúcares por HPLC- PAD

- *Análise Cromatográfica*

Realizou-se através de um sistema HPLC-PAD (DIONEX) com detector eletroquímico ED40, sistema de bombas GP50, detector de pulso amperométrico: eletrodo de ouro, software para aquisição e processamento de dados, pré-coluna e coluna carbopac PA100. A pré-coluna e a coluna foram conectadas em série seguindo as condições padrão de uso.

- *Preparo da Fase Móvel*

O critério para análise dos açúcares em HPLC-PAD é a solubilidade da fase móvel. A fase móvel utilizada foi NaOH 300 mM, acetato de sódio 600 mM em NaOH 130 mM e água ultra pura Milli-Q. A fase móvel foi degaseificada durante 5 minutos com nitrogênio. O fluxo do eluente 1 mL/min.

- *Identificação e Quantificação das Amostras*

As amostras foram retiradas em vários intervalos de tempo, estas foram diluídas convenientemente, para ficar numa faixa de concentração de 10-100 mg/l, para assim serem identificadas e quantificadas através de um sistema de cromatografia de íons (HPLC-PAD), com detector amperimetria pulsada (PAD).

Para a identificação e quantificação dos açúcares foi construída a curva de calibração e para a construção desta curva foram preparadas soluções padrões de: glicose, frutose e sacarose da Merk. A integração dos picos para cada padrão foi otimizado com base no melhor coeficiente de regressão obtido. Utilizando o software PEAKNET de aquisição de dados foi obtida a curva padrão para quantificação das amostras (Santos, 2002).

- *Injeção das Amostras no Sistema HPLC-PAD*

As amostras foram injetadas em uma coluna carbopac PA100, utilizando um amostrador automático (SpectoSERIES AS 100), nas seguintes condições de operação.

Temperatura ambiente: 22 – 24°C

Detector de pulso amperométrico: eletrodo de ouro

Volume de injeção: 25 µl

Fluxo do eluente: 1,0 mL/min

Fase móvel: NaOH 300 mM, acetato de sódio 600 mM em NaOH 130 mM e água Milli-Q.

b) Determinação de Açúcares Redutores (Miller, 1959)

O método consiste na reação de 0,5 ml de amostra convenientemente diluída com 0,5 ml do reagente DNS, por 5 minutos em banho-maria. Resfria-se imediatamente a solução em gelo e adiciona-se 8 ml da solução de tartarato de sódio e potássio 11,25 g/l previamente preparada. O teste em branco foi feito pela substituição da amostra por água destilada.

A reação de DNS com açúcares redutores produz coloração amarela, cuja intensidade é proporcional a concentração de açúcares redutores presentes na amostra. Para a determinação dessa concentração, elabora-se uma curva padrão com soluções de açúcar de concentrações conhecidas (0,2 a 2,0 g/l). Faz-se as leituras da absorbância das soluções em espectrofotômetro modelo DU 640 da Beckman Coulter, em comprimento de onda de 540 nm, estabelecendo-se pela curva padrão uma correlação linear entre absorbância e concentração de açúcares.

Tabela 10: Composição do reagente DNS:

Componente	Quantidade
água destilada	1416 ml
ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	10,6 g
hidróxido de sódio	19,8 g
fenol (fundido a 50°C)	7,6 ml
metabissulfito de sódio	8,3 g

Dissolver os três primeiros reagentes a quente, e adicionar os dois últimos.

4.5.3 Atividade enzimática

Determina-se a atividade da enzima dextrana-sacarase pela velocidade inicial de frutose produzida durante a reação com sacarose em pH 5,2 e temperatura de 30°C.

Em um reator de vidro encamisado de 25 ml, agitado mecanicamente e com temperatura controlada por um banho termostatizado externo, adiciona-se 2 ml de uma solução de sacarose 600 g/l (diluída em tampão acetato de sódio 20 mM com 0,05 g/L de CaCl₂); 0,5 ml de tampão acetato de sódio 20 mM com 1,2 g/l de CaCl₂; 8,5 ml de água destilada e 1 ml da amostra da solução enzimática.

A cada 3 minutos retira-se uma amostra de 1 ml até completar 12 minutos, e determina-se a quantidade de frutose produzida neste período, de acordo com o método DNS para determinação de açúcares redutores descrito anteriormente. A partir dos valores de absorvância lidos no espectrofotômetro a 540 nm, constrói-se um gráfico de absorvância versus tempo. Calcula-se a atividade a partir da equação abaixo:

$$Ativ. (UDS/ml) = \frac{\alpha \cdot \beta \cdot d \cdot 60}{0,52}$$

Onde:

α [Abs/t] - coeficiente angular da curva de absorbância vs. Tempo

β [g/Abs] - coeficiente angular da curva padrão de açúcares redutores

d [ml] - volume de diluição final no reator de vidro

4.6. RENDIMENTOS

4.6.1. Rendimento de dextrana e oligossacarídeos

$$Y_{D/S} = \frac{M_{SS} \times 0,474 \times \%D}{M_S \times 100}$$

Onde:

M_{SS} = Massa de sacarose utilizada na síntese [g]

M_S = Massa total de sacarose utilizada no processo (inóculo, fermentação, alimentação)

$\%D$ = Composição porcentual da dextrana

0,474 = máximo rendimento de dextrana

4.6.2. Rendimento de frutose produzida na síntese

$$Y_{F/S} = \frac{M_F}{M_S}$$

Onde:

M_F = Massa de frutose produzida no processo

M_S = Massa total de sacarose consumida no processo

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRODUÇÃO DE DEXTRANA-SACARASE

Para se produzir dextrana, dividiu-se o processo em duas etapas: a produção da enzima, com mínima formação de dextrana, e a síntese de dextrana. Para a alta produção de enzima, realizou-se uma fermentação em batelada alimentada, com adição de uma solução sódica de sacarose regulada pelo controle de pH.

Foram realizadas diversas fermentações para a produção da enzima dextrana-sacarase, cujas atividades finais estão representadas na Tabela 11.

Tabela 11: Atividade enzimática da dextrana-sacarase no final das fermentações

Fermentação	UDS/mL	pH final
1	95,33	5,35
2	80,79	5,30
3	86,54	5,20

Essas fermentações apresentaram os valores atividades enzimáticas finais esperados, já que Mibielli (2001) obteve atividade entre 89 e 101 UDS/ml, no fim da fermentação e Bazán (1993) encontrou atividades máximas de 106 UDS/ml.

Foram realizadas medidas de atividade enzimática da dextrana-sacarase também durante a fermentação. Para visualizar a produção apresentamos os resultados da Fermentação 1 na Tabela 12 e Figura 09.

Tabela 12: Evolução da atividade enzimática durante a fermentação

Tempo (h)	Atividade (UDS/ml)
0	0
2	5,31
3,5	29,22
4,5	35,75
5,5	59,30
7	95,33

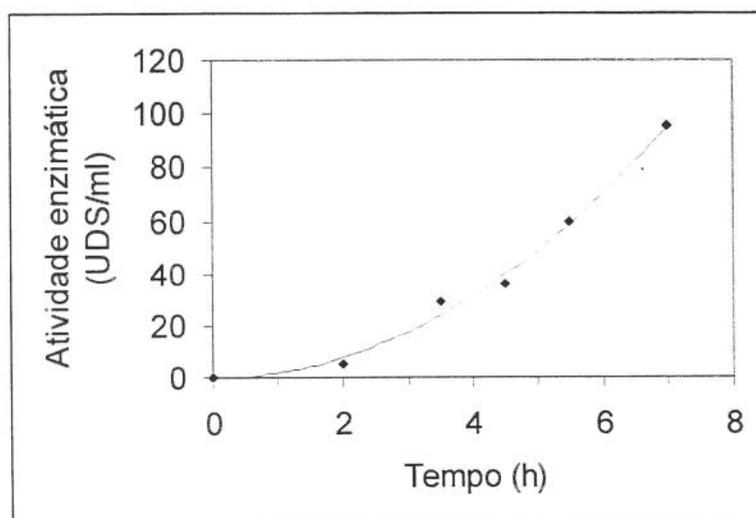


Figura 09: Variação da atividade enzimática durante a fermentação em batelada alimentada

5.2. PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

A enzima produzida na fermentação somente foi estocada após a purificação. Durante o processo de purificação observou-se uma variação na quantidade de enzima em solução, como mostra a Tabela 13.

Tabela 13: Acompanhamento da atividade enzimática durante a purificação da enzima dextrana-sacarase

Enzima	Atividade Total
Enzima bruta	349.560
Enzima concentrada	282.372
Enzima purificada	349.600

A perda de atividade ocorrida na fase de concentração foi causada não somente pelo processo de ultrafiltração, quando uma grande pressão é exercida sobre a solução, mas também devido à presença de microfuros nas membranas do ultrafiltro. Foi observado que o permeado ainda possuía atividade enzimática de aproximadamente 9 UDS/ml, o que representou a perda de 22.700 UDS. Outro fator que causa desnaturação da enzima é a formação de espuma e o aumento de temperatura também ocorrido na etapa de ultrafiltração. Entretanto observa-se na Tabela 13 que após a fase de purificação, propriamente dita, ocorre um aumento de atividade, principalmente pela presença de íons de cálcio, adicionados na solução tampão acetato de sódio usada na rediluição da enzima. Alsop (1983) foi o primeiro a observar o ganho de atividade causado pela adição de 0,05% de cloreto de cálcio e Mibielli (2001) observou um ganho de atividade de 64% com a adição desta solução de cálcio.

Observou-se também que mesmo após a estocagem a -15°C por 55 dias a enzima ainda apresentava aproximadamente 83% de sua atividade inicial. Essa perda de atividade está de acordo com os estudos de Mibielli (2001) que encontrou uma perda de 21% da atividade da enzima purificada em 79 dias de

estocagem a -10°C . Este ganho de estabilidade se deve a presença de íons de Ca, adicionados à solução de rediluição, ao polietilenoglicol usado na etapa de purificação e à presença de dextrana formada no fim da fermentação, após o corte da alimentação.

5.3. SÍNTESE DE DEXTRANA BRUTA (NATIVA)

A síntese de dextrana foi realizada com a enzima purificada, obtida após ultrafiltração e precipitação com PEG 1500, conforme descrito no item Material e Métodos. Foram estudadas três condições de síntese, uma com alta concentração e uma de baixa concentração enzimática e com a substituição do açúcar cristal pela sacarose P.A.. Considerando-se a dextrana de alto peso molecular aquela com peso molecular acima de 100.000 Da, a dextrana clínica com peso molecular entre 30.000 e 100.000 Da e a dextrana de baixo peso molecular, aquela com peso molecular abaixo de 30.000 Da, construiu-se as Tabelas 14, 15 e 16.

Tabela 14: Evolução da síntese de dextrana com açúcar cristal e 40 UDS/ml

Tempo (h)	% dextrana		
	Alto peso	Clínica	Baixo peso
0,0	0	0	100
0,5	9,64	0,17	90,19
1,0	16,37	2,59	81,04
1,5	21,14	3,22	75,64
2,0	21,95	3,62	74,43
2,5	22,09	3,75	74,16

Tabela 15: Evolução da síntese realizada com sacarose P.A e 40 UDS/ml

Tempo (h)	% dextrana (40 UDS/ml)		
	Alto peso	Clínica	Baixo peso
0,0	3,16	0,36	96,48
0,5	7,96	0,35	91,69
1,0	14,39	1,46	84,15
1,5	16,79	1,82	81,39
2,0	22,09	2,80	75,11
2,5	21,67	4,14	74,19

Observando-se as Tabelas 14 e 15 verifica-se que não há diferença entre o uso de açúcar cristal e de sacarose P.A., então como o açúcar cristal tem valor comercial muito menor que a sacarose P.A., sua utilização é muito mais vantajosa.

Tabela 16: Evolução da síntese de dextrana com açúcar cristal e 160 UDS/ml

Tempo (h)	% dextrana		
	Alto peso	Clínica	Baixo peso
0,0	7,69	1,45	90,86
0,5	34,06	0,46	65,48
1,0	39,07	0,72	60,21
1,5	39,77	0,72	59,51
2,0	40,23	3,03	56,74
2,5	44,34	1,43	54,23

Ao se comparar esta última síntese (Tabela 16) com as anteriores, observa-se que esta foi muito mais eficiente na formação de dextrana de alto peso molecular, mas também não é economicamente viável devido à alta concentração de enzima necessária.

Porém o rendimento de dextrana de alto peso molecular não se encontra nos mesmos patamares encontrados por Mibielli (2001), cujas sínteses resultavam

em aproximadamente 70% de dextrana de alto peso molecular. Então para uma melhor visualização da síntese fez-se o acompanhamento das concentrações de sacarose e frutose, nas condições da primeira síntese (40 UDS/ml, 50 g/l açúcar cristal), como mostra a Tabela 17.

Tabela 17: Concentrações de açúcares durante a síntese

Tempo (h)	Frutose (g/l)	Sacarose (g/l)
0	2,20	46,28
0,5	10,53	22,23
1	13,04	6,56
1,5	16,62	1,26
2	18,99	0,28
2,5	19,56	0,19

Pode-se observar nesta tabela que apesar de não termos formado grande quantidade de dextrana de alto peso molecular, em 2,5 horas de reação chega-se ao esgotamento da sacarose, o que indica que por motivos ainda não esclarecidos, a enzima produzida não possui a mesma especificidade da utilizada por Mibielli (2001).

5.4. OBTENÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA

Foram realizadas hidrólises ácida em três condições diferentes a fim de proporcionarmos a conversão de dextrana de alto peso molecular em dextrana clínica. Este método consiste na redução da massa molecular da dextrana utilizando-se altas temperaturas e baixos pH.

O primeiro experimento foi realizado a 72°C e pH 1,0, condição ótima de processo encontrada por Guimarães *et al.* (1999) a partir de um modelo matemático descrito com o auxílio da metodologia de planejamento experimental. Os resultados desta hidrólise estão mostrados na Tabela 18.

Deve-se observar que nas três hidrólises a distribuição da massa molecular não confere com o resultado da síntese, isto se deve ao fato de termos realizado diálises com peso molecular de exclusão de 14.000 Da, para a retirada dos sais que interferem na análise cromatográfica.

Tabela 18: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana obtida na 1ª hidrólise ácida (72°C, pH1,0)

Tempo (h)	% Dextrana		
	PM>100.000	Clínica	PM<30.000
0,0	64,29	7,50	28,21
0,5	79,09	8,02	12,89
1,0	77,75	10,18	12,07
1,5	72,53	12,83	14,64
2,0	66,10	16,33	17,57
2,5	61,85	17,92	20,23
3,0	62,81	20,64	16,55
3,5	54,00	23,21	22,79
4,0	44,09	27,17	28,74
4,5	43,05	25,20	31,75
5,0	37,42	26,33	36,25
5,5	37,31	27,14	35,55
6,0	30,06	29,51	40,43
6,5	29,64	28,89	41,47
7,0	27,02	27,30	45,68
7,5	25,86	27,98	46,16
8,0	22,86	28,80	48,34
8,5	20,90	27,79	51,31
9,0	18,71	27,76	53,53
9,5	16,84	27,46	55,70
10,0	15,95	26,42	57,63

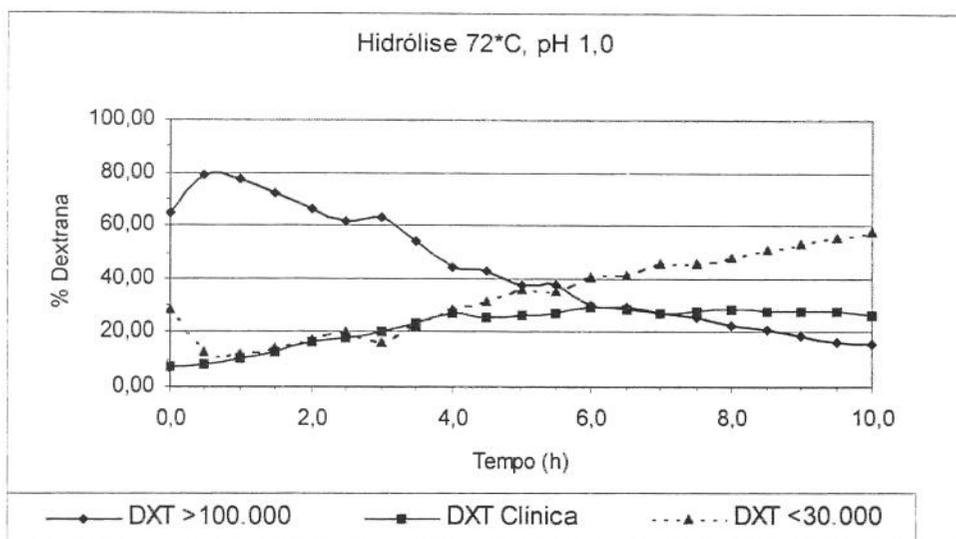


Figura 10: Hidrólise ácida da dextrana a 72°C e pH 1,0.

Observa-se, neste primeiro experimento, que a porcentagem máxima de dextrana clínica obtida é de aproximadamente 30%, ocorrendo na sexta hora de reação, apesar de ainda ter-se grande porcentagem de dextrana de alta massa molecular (30%). Ao prolongar-se a reação de hidrólise observa-se a diminuição destas porcentagens e ao aumento da porcentagem de dextrana de baixa massa molecular.

No segundo experimento, seguiu-se as condições nas quais Wolf *et al.* (1954) conseguiram bons resultados de conversão, fixando-se o pH em 1,0 e elevando-se a temperatura para 76°C. Os resultados da segunda hidrólise ácida são mostrados na Tabela 19.

Tabela 19: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana obtida na 2ª hidrólise ácida (76°C, pH 1,0)

Tempo (h)	% Dextrana		
	PM>100.000	Clínica	PM<30.000
0,0	64,29	5,39	30,32
0,5	79,09	9,67	11,24
1,0	77,75	12,11	10,14
1,5	72,53	17,61	9,86
2,0	66,10	20,97	12,93
2,5	61,85	23,48	14,67
3,0	62,81	26,03	11,16
3,5	54,00	27,51	18,49
4,0	44,09	27,93	27,98
4,5	43,05	28,36	28,59
5,0	37,42	26,75	35,83
5,5	37,31	28,07	34,62
6,0	30,06	27,18	42,76
6,5	29,64	26,42	43,94
7,0	27,02	26,32	46,66
7,5	25,86	26,30	47,84
8,0	22,86	23,99	53,15
8,5	20,90	24,56	54,54
9,0	18,71	24,20	57,09
9,5	16,84	22,59	60,57
10,0	15,95	21,24	62,81

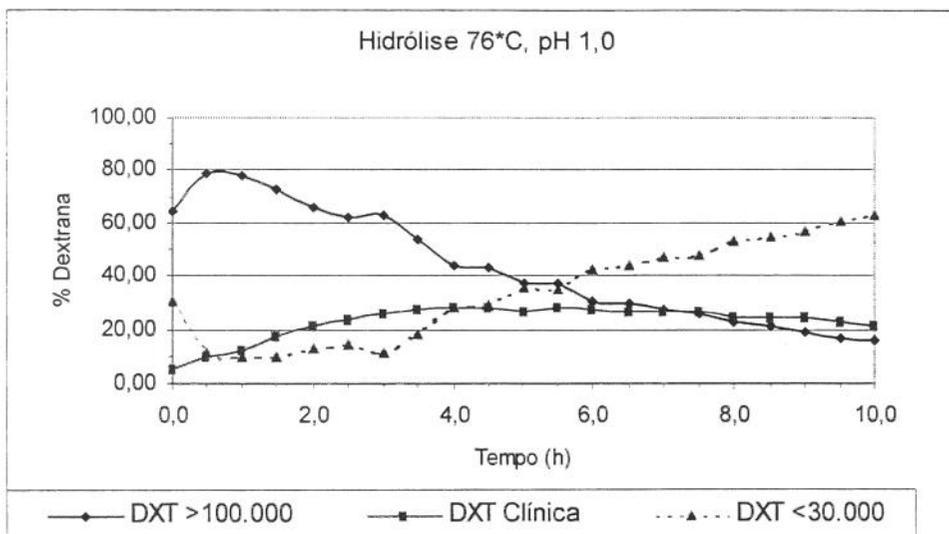


Figura 11: Hidrólise ácida de dextrana a 76°C e pH 1,0

Observa-se neste caso, o mesmo comportamento ocorrido na primeira condição de hidrólise, com a diferença de que o máximo de conversão ocorre por volta de 4,5 horas de reação.

A terceira hidrólise foi realizada em temperatura de 76°C e pH 1,5, condições nas quais Mibielli (2001) obteve maior percentual de conversão de dextrana bruta em dextrana clínica. Os resultados da terceira hidrólise ácida são mostrados na Tabela 20.

Tabela 20: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana obtida na 3ª hidrólise ácida (76°C, pH1,5)

Tempo (h)	% Dextrana		
	PM>100.000	Clínica	PM<30.000
0,0	76,30	4,16	19,54
0,5	77,41	4,91	17,68
1,0	77,07	6,61	16,32
1,5	75,29	8,95	15,76
2,0	72,84	10,85	16,31
2,5	67,64	12,91	19,45
3,0	63,82	14,88	21,30
3,5	62,31	15,88	21,81
4,0	57,30	17,94	24,76
4,5	56,06	20,17	23,77
5,0	49,78	20,59	29,63
5,5	47,15	21,67	31,18
6,0	42,94	23,94	33,12
6,5	42,21	24,56	33,23
7,0	38,23	26,12	35,65
7,5	34,28	26,09	39,63
8,0	29,89	27,86	42,25
8,5	26,96	27,51	45,53
9,0	26,66	29,14	44,20
9,5	22,86	27,14	50,00
10,0	20,20	27,83	51,97

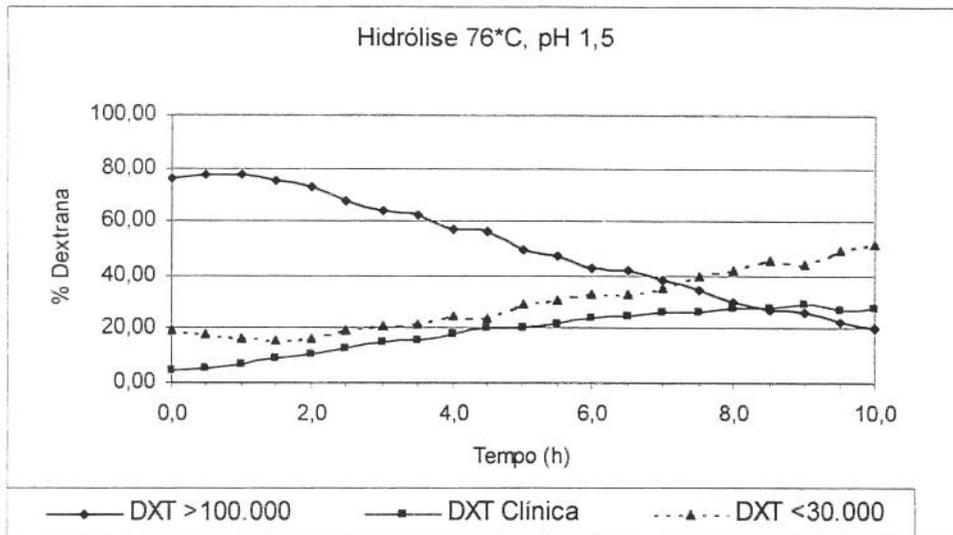


Figura 12: Hidrólise ácida de dextrana a 76°C e pH 1,5.

Observa-se nos resultados da Tabela 20 que apesar de ter sido considerada a melhor condição de hidrólise por Mibielli (2001) não ocorreu uma hidrólise eficiente. Observando-se também que o pH é um fator importante para que ocorra a reação, já que ao mudar-se o pH de 1,0 para 1,5 tem-se um incremento no tempo de reação de 4,5 / 6 horas para 10 horas para a obtenção da mesma conversão. Comparando as 3 condições de hidrólise temos a Figura 12.

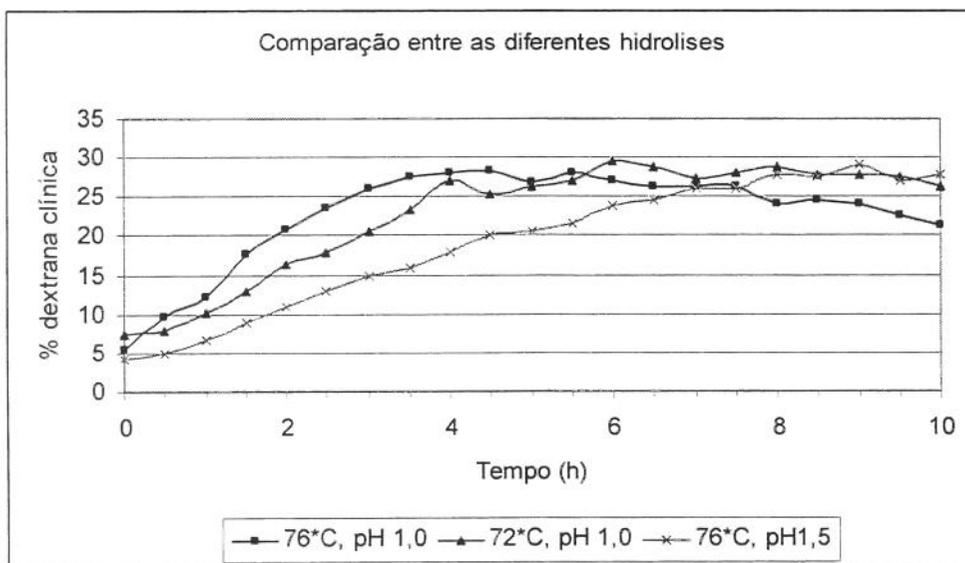


Figura 13: Comparação entre as diferentes condições de hidrólise

Observando-se a Figura13, vemos que na condição de 76°C, pH1,0, obtém-se 30% de dextrana clínica em solução, após aproximadamente 4 horas de reação, enquanto que a 72°C estes valores são alcançados somente por volta da 6 hora. No caso da terceira condição, observa-se que a hidrólise foi muito lenta, alcançando-se aproximadamente 30% de dextrana clínica em solução somente na décima hora de reação.

5.5. OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS

Durante a síntese foi observado que grande parte do que foi produzido possuía baixo peso molecular, menor que 30.000 Da, analisando-se mais detalhadamente este produto, chegamos à seguinte tabela de composição:

Tabela 21: Composição percentual do sintetizado de baixa massa molecular

Peso molecular (Da)	Porcentagem (%)
30.000 - 20.000	0,49
20.000 - 10.000	1,17
10.000 - 5.000	1,43
Menores de 5.000	71,07
5.000 - 1.000	7,38
Menores de 1.000	63,69
frutose	39,53

Deve-se observar que a grande porcentagem de oligossacarídeo de peso molecular abaixo de 1.000 Da se deve principalmente à presença de frutose, que equivale a aproximadamente 39% em peso de todo o produto formado.

Após a hidrólise a 76°C e pH 1,0, tem-se a formação de mais dextrans de baixo peso molecular e oligossacarídeos, esses valores estão representados na Tabela 22.

Tabela 22: Composição percentual da fração de baixo peso molecular, após hidrólise e ultrafiltração

Peso molecular (Da)	Porcentagem (%)
30.000 - 20.000	6,95
20.000 - 10.000	11,22
10.000 - 5.000	10,19
5.000 - 1.000	15,91

5.6. Fracionamento

5.6.1. Determinação de X% e Y%

Para a precipitação da dextrana clínica foram realizados fracionamentos com etanol 95% em concentrações diferentes, partindo-se das condições encontradas por Mibielli (2001).

Mantendo-se a temperatura em 25°C e uma vazão de adição de etanol 95% de 4 ml/min, realizou-se um primeiro estudo de fracionamento, para a determinação do valor de X% (Tabela 23).

Tabela 23: Estudo do fracionamento (X%)

% Etanol	Fase	Distribuição percentual de peso molecular		
		PM>100.000	Clínica	PM<30.000
inicial		32,60	20,66	46,74
39	Precipitado (A)	78,13	16,04	5,83
	Sobrenadante (B)	10,00	21,54	68,46
39,5	Precipitado(A)	81,9	13,28	4,82
	Sobrenadante (B)	7,38	20,36	72,12

A primeira observação a ser feita é sobre a composição da amostra inicial, ou seja, da dextrana hidrolisada filtrada. Esta composição está diferente da encontrada no estudo da hidrólise ácida porque a retirada dos sais foi realizada com o auxílio de um ultrafiltro de 1000 Da de massa molecular de exclusão ao invés de tubos de diálise de 14.000 Da de massa molecular de exclusão.

Como as duas condições de fracionamento se mostraram satisfatórias, havendo pequena diferença entre elas, resolveu-se estudar o conjunto X e Y% (Tabela 24 e 25).

Tabela 24: Primeiro estudo de fracionamento (X e Y%)

% Etanol	Fase	Distribuição percentual de peso molecular		
		PM>100.000	Clínica	PM<30.000
inicial		32,60	20,66	46,74
X% 39	Precipitado (A)	78,13	16,04	5,83
	Sobrenadante(B)	10,00	21,54	68,46
Y% 43 46	Precipitado (B-1)	48,18	36,89	14,93
	Sobrenadante (C)	1,63	15,84	82,48
	Precipitado (B-1)	41,64	42,92	15,39
	Sobrenadante (C)	0,82	20,25	78,93

Tabela 25: Segundo estudo de fracionamento (X e Y%)

	% Etanol	Fase	Distribuição percentual de peso molecular		
			PM>100.000	Clínica	PM<30.000
	inicial		32,60	20,66	46,74
X%	39,5	Precipitado (A)	81,9	13,28	4,82
		Sobrenadante (B)	7,38	20,36	72,12
Y%	43	Precipitado (B-1)	49,24	41,09	9,67
		Sobrenadante (C)	2,86	19,65	77,49
	45,5	Precipitado (B-1)	44,26	41,70	14,04
		Sobrenadante (C)	1,30	17,54	81,16

Analisando-se as duas tabelas acima, observa-se que ao adicionar-se 43% de etanol, nos dois casos tem-se um precipitado composto de maior porcentagem de dextrana de massa molecular acima de 100.000 Da, mas ao adicionar-se 45,5 ou 46%, o precipitado se torna composto de partes de dextrana clínica e de alta massa molecular praticamente iguais, possuindo uma quantidade ligeiramente superior de dextrana clínica. Como o precipitado (B-1) de Y igual a 46% possui uma porcentagem de dextrana clínica um pouco maior que o de Y de 45,5%, assume-se que a melhor condição de fracionamento é de X de 39% e Y de 46%, quando consegue-se precipitar na Fração B-1, 68% da dextrana clínica presente na Fração B. Mibielli (2001) encontrou também melhores resultados nas mesmas condições.

A utilização de Y de 46% também favorece a eliminação completa da dextrana de alto peso molecular da solução, resultando numa solução composta principalmente de dextrana de baixa massa molecular e oligossacarídeos.

5.6.2. Estudo de Z%

Na tentativa de se recuperar a dextrana clínica que precipita juntamente com a dextrana de alta massa molecular na Fração A, fez-se um estudo de Z%, analisando-se somente o sobrenadante (Fração E). Este estudo está representado na Tabela 26.

Tabela 26: Estudo de Z%

% Etanol	Distribuição percentual de peso molecular		
	>100.000	Clínica	<30.000
0 (A)	78,13	16,04	5,83
29	74,55	18,44	7,01
32	74,43	19,02	6,55
33	74,02	19,17	6,81
34	74,57	18,63	6,80
36	75,31	17,92	6,77
39	0	0	100

Observando-se a Tabela 26, verifica-se que a adição de 29 a 36% de etanol não favoreceu nenhuma separação das frações, mas ao adicionarmos 39%, houve a precipitação de praticamente tudo o que estava em solução, ou seja, não foi possível realizar uma melhor separação das frações que compõem o precipitado ocasionado pela adição de 39% de etanol.

A única forma de reaproveitar-se este produto é re-hidrolizando-o para futuro fracionamento, ou aplicando a metodologia de cromatografia de permeação em gel.

5.6.3. Estudo da purificação da dextrana clínica

Como a fração clínica (B-1) é composta também de grande porcentagem de dextrana de massa molecular maior de 100.000 Da, fez-se um estudo do fracionamento da fração clínica, realizando-se a adição de 35 a 48% de etanol, analisando-se somente o sobrenadante (Tabela 27).

Tabela 27: Estudo da purificação da fração clínica

% Etanol	Distribuição percentual de peso molecular		
	PM>100.000	Clínica	PM<30.000
0 (B-1)	41,64	42,92	15,39
35	48,48	39,57	11,95
37	46,19	41,71	12,10
39	45,05	41,52	13,43
40	36,55	47,05	16,40
41	23,44	54,74	21,82
42	24,49	56,03	19,48
43	17,32	57,04	25,64
44	8,68	61,14	30,18
45	4,25	52,37	43,38
46	1,88	45,23	52,89
48	0,18	35,97	63,85

Observa-se, na Tabela 27, que para que ocorra uma eliminação expressiva da dextrana de alto peso molecular, deve-se adicionar de 44 a 48% de etanol, mas isso também resulta numa grande perda de dextrana clínica, diminuindo a sua porcentagem na fração. Caso seja aceito a presença de até 10% de dextrana de alta massa molecular (Wolf et al., 1954), a adição de 44% de etanol seria suficiente, mas ainda teríamos o problema de que ainda haveria 30,18 % de

dextrana de baixo peso molecular, sendo necessário, portanto, um novo método de purificação, para a retirada destes oligossacarídeos.

5.6.4. Tentativa de fracionamento das dextranas D75 e D40

Com o intuito de conhecer-se a porcentagem de D75 (75.000 ± 25.000 Da) e de D40 (40.000 ± 10.000 Da) presentes, no sobrenadante, nas mesmas condições do item anterior, construiu-se a Tabela 28.

Tabela 28: Distribuição percentual de dextrana D75 e D40

% Etanol	Distribuição percentual de massa molecular	
	D40	D75
35	15,09	26,59
37	14,01	26,91
39	13,94	26,73
40	16,36	30,42
41	20,33	34,07
42	20,36	34,16
43	25,93	30,84
44	23,50	36,16
45	29,73	28,29
46	28,55	19,66
48	25,61	11,67

Pode-se observar portanto, que além de não ocorrer a purificação da fração clínica, com a adição de 35 a 48% de etanol, não ocorre precipitação seletiva entre as frações D40 e D75.

5.6.5. Fracionamento a 15°C

Estudou-se o fracionamento a 15°C, para verificarmos se há influência da temperatura no processo de fracionamento. Para o estudo do valor de X%, realizou-se a adição de 38 a 39% de etanol 95%, analisando-se somente o sobrenadante (Fração B), cujos resultados estão representados na Tabela 29.

Tabela 29: Distribuição das massas moleculares no sobrenadante do fracionamento a 15°C

% Etanol	Distribuição percentual de massa molecular		
	PM>100.000	Clínica	PM<30.000
inicial	32,60	20,66	46,74
38	7,28	23,96	68,76
38,5	6,02	23,07	70,91
39	4,61	21,26	74,13

Como era esperado, o valor de X mais adequado foi de 39%, o mesmo que para 25°C, por eliminar a maior quantidade de dextrana de alta massa molecular. A partir deste resultado seguiu-se para o estudo do valor de Y%.

Para o estudo do valor de Y%, construiu-se a Tabela 29, onde o valor de Y varia de 42 a 46%, e onde se representou o resultado da adição de X de 39%, analisando-se não somente o sobrenadante, mas também o precipitado.

Observando-se a Tabela 30, vemos que a adição de 46% de etanol é a mais eficiente para promover a precipitação de praticamente toda a dextrana clínica, ainda restando uma certa porcentagem desta fração em solução. Porém, pode-se observar que a adição de 46% também precipita quase toda a dextrana de alta massa molecular presente na solução inicial, após adição de X de 39%.

Portanto não há diferença nos valores de X e Y% quando compara-se o fracionamento a 25 e a 15°C, mas há uma grande diferença de eficiência. Na temperatura de 15°C a separação é muito mais eficiente, conseguindo-se recuperar 88% da dextrana clínica presente na solução B, após a adição de X%.

Tabela 30: Estudo do fracionamento a 15°C (X e Y%)

	% Etanol	Fase	Distribuição percentual de peso molecular		
			PM>100.000	Clínica	PM<30.000
	inicial		32,60	20,66	46,74
X%	39	Precipitado (A)	67,18	24,68	8,14
		Sobrenadante (B)	4,61	21,26	74,13
	42	Precipitado (B-1)	43,06	39,43	17,51
		Sobrenadante (C)	1,56	13,49	84,95
	42,5	Precipitado (B-1)	17,73	53,27	29,00
		Sobrenadante (C)	0,91	13,44	85,65
	43	Precipitado (B-1)	14,17	57,46	28,37
		Sobrenadante (C)	0,87	12,88	86,25
Y%	45	Precipitado (B-1)	26,93	50,85	22,22
		Sobrenadante (C)	0,29	14,87	84,84
	45,5	Precipitado (B-1)	32,66	49,45	17,89
		Sobrenadante (C)	0,15	11,66	88,19
	46	Precipitado (B-1)	26,98	45,44	27,58
		Sobrenadante (C)	0,04	5,98	93,98

Esta dificuldade de se fazer um bom fracionamento é devido não somente às dificuldades do processo em si, mas também à baixa concentração de dextrana clínica na solução inicial, fato decorrente da síntese ineficiente quanto à produção de dextrana de alta massa molecular.

5.7. SEPARAÇÃO DA FRUTOSE

5.7.1. Ultrafiltração

Para uma separação inicial de frutose da dextrana, foi utilizado um ultrafiltro de porosidade de 1.000 Da, com o objetivo de fazer-se uma diafiltração. Foi observado, de acordo com a Tabela 31 que a separação se completa após passar-se 3 vezes o volume inicial pelo permeado.

Tabela 31: Eficiência do ultrafiltro na separação da frutose

Quantidade de volume no permeado	ART (g)	HPLC-PAD (g frutose)
1/3	2,54	1,254
1	12,9	9,042
2	20,28	13,504
3	25,88	18,172
Cálculo estequiométrico		26,30

Analisando-se no HPLC-PAD as amostras de permeado verificou-se a presença de outros açúcares, como glicose, di e trissacarídeos, o que torna o método eficiente para uma separação inicial de frutose, mas não para a obtenção de uma solução pura de frutose.

5.7.2. Coluna de separação com zeólitas BaY

Após o uso da coluna, foram realizadas análises em GPC, para determinação das porcentagens de dextrana e frutose presentes nas alíquotas e também análises no HPLC-PAD (Dionex) para quantificação da frutose, possibilitando assim a obtenção de um valor de concentração para a dextrana.

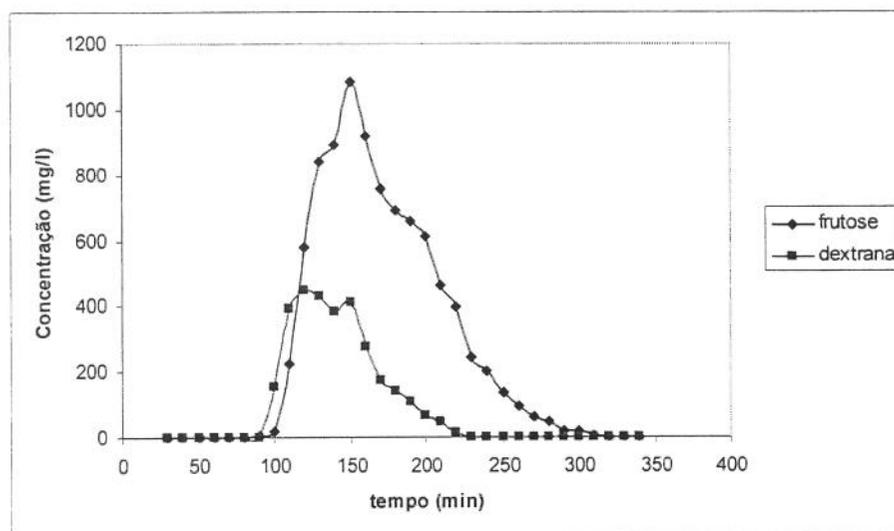


Figura 14: Perfil de eluição de frutose e dextrana em coluna com zeólita

Pode-se verificar, através da Figura 14, que a dextrana aparece primeiramente no eluente, sendo seguida da frutose. Calculando-se os coeficientes que medem o grau de separação temos: $ES = 0,92$ e $\alpha = 2,10$.

Essa discrepância entre os valores está relacionada à forma de cálculo do coeficiente. No caso do fator de seletividade (α) leva-se em conta os valores dos tempos de retenção médios. Os tempos de retenção obtidos foram: $\bar{t}_F = 170,6$ e $\bar{t}_D = 141,1$. Como há uma diferença significativa entre eles pode-se concluir que há uma boa separação entre frutose e dextrana.

Já no caso do coeficiente de eficiência de separação (ES), leva-se em conta também a distribuição da curva (σ). Calculando-se este fator, chega-se a um valor alto, e como o ES resulta da divisão do tempo de residência pelo fator σ ,

temos um ES menor, indicando que não há separação muito eficiente entre a frutose e a dextrana.

Conclui-se que apesar de haver um certo grau de separação entre a frutose e a dextrana, na prática, utilizando-se a coluna de zeolitas, o efeito de purificação de frutose vai ser pequeno, talvez devido à interferência de outros açúcares presentes na solução de dextrana nativa, ou mesmo outros resíduos quaisquer que podem interferir na ação das zeolitas (tampão, sais, etc.). Burkert (2001), utilizando padrões de dextranas, obteve resultados cujos perfis de eluição são uniformes (sem picos) e que mostram uma maior separação entre a dextrana e a frutose. Mas esse método também não se mostra prático do ponto de vista de processo, devido à necessidade de se diluir a dextrana nativa em 1/5, para evitar entupimento da coluna.

5.8. RECUPERAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS E DEXTRANA EM FPLC (FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY)

Na tentativa da eliminação de oligossacarídeos presentes na fração clínica, e conseqüentemente sua recuperação, utilizou-se a metodologia de permeação em gel, em colunas HILOAD 16/60 (Pharmacia Biotech), empacotadas com gel Superdex 75 ou 200.

5.8.1. Gel Superdex 75

O perfil de eluição obtido pela leitura de absorbância (UV) em 206 nm é mostrado na Figura 15.

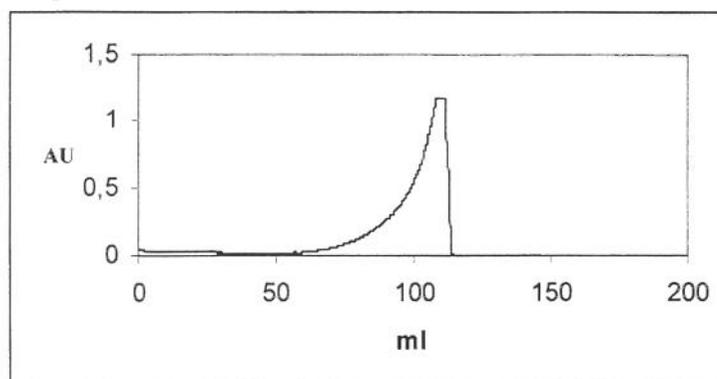


Figura 15: Perfil de eluição na coluna HILOAD 16/60 com gem Superdex 75

Analisando-se as amostras por cromatografia líquida (GPC), pode-se obter somente os dados apresentados na Tabela 32. A amostra usada para a avaliação da coluna continha 14,31 % de dextrana de massa molecular menor de 30.000 Da.

Tabela 32: Avaliação em GPC da coluna com gel Superdex 75

Tempo (min)	% dextrana de PM < 30.000 Da
55	8,18
60	17,51
65	23,98
70	46,56
75	69,89
80	59,49
85	54,54

Observando-se a tabela acima, conclui-se que pode-se obter uma solução de dextrana clínica com menos de 10% de oligossacarídeos de peso molecular menor de 30.000 Da, colhendo-se a amostra em até 55 minutos.

Analisando-se a composição porcentual da amostra obtida em 55 minutos, temos 28,56% de dextrana de alto peso molecular, 63,26% de dextrana clínica e 8,18 % de dextrana de baixo peso molecular. Isto indica que o método foi eficiente para a separação dos oligossacarídeos que não são eliminados pelo fracionamento com etanol.

5.8.2. Gel Superdex 200

Neste caso foi utilizado um gel com faixa de exclusão mais ampla, sendo o perfil obtido, pela aplicação de leitura em 206 nm (UV), representado na Figura 16.

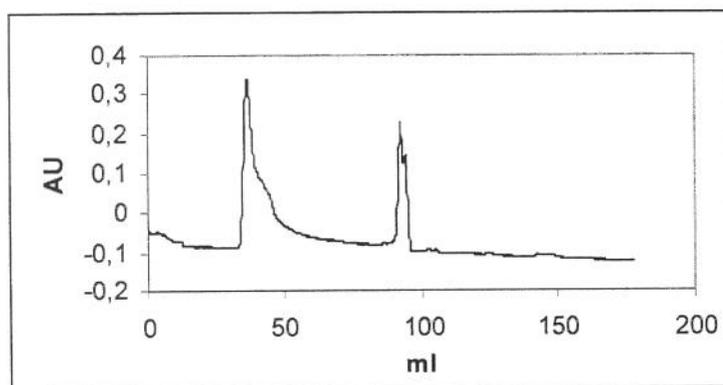


Figura 16: Perfil de eluição na coluna HILOAD 16/60 com gel Superdex 200.

Analisando-se as amostras por cromatografia líquida (GPC), temos a Tabela 33. A amostra usada para a avaliação da coluna continha 14,31 % de dextrana de massa molecular menor de 30.000 Da.

Tabela 33: Avaliação em GPC da coluna com gel Superdex 200

Tempo (min)	Composição porcentual (%) de dextrana	
	PM > 100.000 Da	PM < 30.000 Da
45	96,42	0,07
50	86,35	0,14
55	65,29	0,81
60	39,39	1,82
65	18,81	4,48
70	8,08	11,16
75	2,58	26,77
80	0,51	54,86
85	0	86,15

Como deseja-se obter um produto com no máximo 10% de oligossacarídeos de peso molecular menor que 30.000 Da, tem-se certeza que ao coletarmos a amostra até 65 minutos, obtem-se o produto. Pode-se ainda desprezar as amostras até 45 minutos, já que elas são compostas somente de dextranas de alto peso molecular, melhorando ainda mais a pureza da solução de dextrana clínica.

Para verificar-se estes resultados, foi realizada uma nova eluição, com um amostra proveniente do fracionamento a 15°C, com X de 39% e Y de 46% de etanol, que continha 26,98% de dextrana de alto peso molecular, 45,44% de dextrana clínica (D40 e D70) e 27,58% de dextrana de baixo peso molecular . Os resultados estão apresentados na Tabela 34.

Tabela 34: Avaliação em GPC, da eluição de amostra após fracionamento a 15°C, em coluna com gel Superdex 200

Tempo (min)	Composição porcentual (%)			
	PM>100.000	D70	D40	PM<30.000
40	98,706	1,108	0,186	0
45	96,031	3,494	0,447	0,028
50	83,647	13,828	1,927	0,598
55	54,508	38,015	5,78	1,697
60	23,423	56,2	15,897	4,48
65	7,043	46,94	33,807	12,21
70	1,688	25,776	43,272	29,264
75	0,364	9,642	32,843	57,151
80	0,037	0,972	11,896	87,095
85	0	0,009	0,64	99,351

Observando-se esta tabela, conclui-se que até 60 minutos, tem-se uma amostra com menos de 10% de oligossacarídeos de peso molecular abaixo de 30.000 Da, como era desejado. Mas a separação entre as frações D40 e D75 não é eficiente, sendo necessário talvez, uma segunda eluição, após a eliminação da dextrana de alto peso molecular e dos oligossacarídeos de baixo peso molecular.

5.9. RENDIMENTOS

Realizou-se os cálculos de rendimentos de dextrana de alto peso molecular e de oligossacarídeos, além do rendimento de frutose durante a síntese.

5.9.1. Rendimento de dextrana e oligossacarídeos na síntese

$$Y_{D/S} = \frac{M_{SS} \times 0,474 \times \%D}{M_S \times 100}$$

Atividade enzimática obtida da fermentação = 349.600 UDS

Como a síntese é realizada com 40 UDS/ml, esta quantidade de enzima resulta em 8,74 litros de síntese.

Como a síntese é realizada com concentração de 50 g/l, temos:

$$M_{SS} = 50 \times 8,74 = 437 \text{ g } \textit{sacarose}$$

$$M_S (\textit{inóculo}) = 0,4 \text{ l} \times 50 \text{ g}$$

$$M_S (\textit{meio + a alimentação}) = (4,0 \text{ l} \times 50 \text{ g}) + (0,67 \text{ l} \times 200 \text{ g})$$

$$M_S = 0,4 \times 50 + 4 \times 50 + 0,67 \times 200 + 437$$

$$M_S = 791 \text{ g}$$

Tabela 35: Rendimentos das diversas frações de dextrana e oligossacarídeos após a síntese

Peso molecular (Da)	Porcentagem	$Y_{D/S}$
>100.000	22,94	0,06
Clínica	2,81	0,007
< 30.000	35,25	0,09
30.000 - 20.000	0,49	0,0013
20.000 - 10.000	1,17	0,0031
15.000 - 5.000	2,25	0,0059
Entre 5.000 e 1.000	7,38	0,0193

Estes resultados demonstram que o rendimento de dextrana de alta massa molecular não foi alto, enquanto que o rendimento de dextrana de baixa massa molecular foi relativamente alto. Deve-se levar em consideração que o rendimento não foi calculado para pesos moleculares abaixo de 1000 Da, devido a influência da grande porcentagem de frutose presente em solução.

5.9.2. Rendimento de frutose produzida na síntese

$$Y_{F/S} = \frac{M_F}{M_S}$$

Frutose produzida na síntese

$$Y_{F/S} = \frac{19,56 \times 8,74}{791} = 0,216$$

Frutose produzida em todo o processo

$$Y_{F/S} = \frac{33,2 \times 5,35 + 19,56 \times 8,74}{791} = 0,441$$

5.9.3. Rendimento de dextrana e oligossacarídeos após hidrólise ácida

Tabela 36: Rendimentos das diversas frações de dextrana e oligossacarídeos após a hidrólise

Peso molecular (Da)	Porcentagem	$Y_{D/S}$
>100.000	33,67	0,08
Clínica	22,06	0,06
< 30.000	44,27	0,116
30.000 - 20.000	6,95	0,018
20.000 - 10.000	11,22	0,029
10.000 - 5.000	10,19	0,027
Entre 5.000 e 1.000	15,91	0,042

Estes resultados demonstram que há um grande aumento no rendimento de dextrana clínica em relação ao rendimento obtido na síntese, e o rendimento de dextrana de baixa massa molecular continuou relativamente alto. Deve-se levar em consideração que o rendimento não foi calculado para pesos moleculares abaixo de 1000 Da, devido a eliminação destes compostos durante a ultrafiltração.

6. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A produção da enzima dextrana-sacarase em batelada alimentada com controle de pH simultâneo, foi eficiente, produzindo-se 95,33 UDS/ml.
- O processo de ultrafiltração deve ser bem controlado, para que não ocorra grande perda de atividade.
- O processo de purificação da enzima com adição de íons de Ca, além de aumentar a atividade, conferiu estabilidade à enzima.
- A síntese enzimática não foi eficiente quanto à produção de dextrana de alto peso molecular, devido a problemas desconhecidos relacionados com o microorganismo e à especificidade da enzima produzida.
- A hidrólise ácida apresentou melhores resultados quando realizada a 76°C, pH 1,0 e 4,5 horas de reação, sendo que após este tempo começa a ocorrer o declínio da quantidade de dextrana clínica produzida, devido a hidrólise desta mesma.
- O estudo do fracionamento a 25°C não foi conclusivo, observando-se que a utilização de X de 39% e Y de 46% permitiu apenas um pequeno grau de separação entre as frações de alto peso molecular e dextrana clínica, sendo possível, entretanto, uma etapa de purificação da dextrana clínica, adicionando-se de 44 a 48% de etanol para a eliminação da dextrana de alto peso molecular
- O fracionamento a 15°C resultou em melhores resultados que a 25°C, concluindo-se que os valores de X e Y devem ser fixos em 39 e 46%.

- O uso de colunas empacotadas com gel Superdex 200, foi mais eficiente que a com gel Superdex 75, para a separação de oligossacarídeos que não são eliminados pelo fracionamento com etanol.
- O processo de diálise em ultrafiltro mostrou-se eficiente para a separação da frutose e dos sais formados na hidrólise ácida.
- O uso de zeólitas para a separação de frutose, nas condições estudadas, não foi adequado.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em consequência das observações e conclusões deste trabalho e de trabalhos anteriores, torna-se oportuno sugerir alguns tópicos para trabalhos futuros.

- Estudar o emprego alternativo de ultrafiltração com limites de exclusão para 100.000 e 30.000 Da.
- Estudar a utilização de outros ácidos na hidrólise da dextrana nativa para a obtenção de melhores rendimentos e simplificação do processo.
- Realizar um scale-up do processo de obtenção de dextrana clínica, frutose e oligossacarídeos a partir da sacarose
- Desenvolver metodologia para a obtenção e purificação dos oligossacarídeos presentes em solução.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALSOP, R. M. Industrial production of dextrans. **Progress in Industrial Microbiology**, v.18, p.1-44, 1983.
02. BARKER, P. E.; GANETSOS, G. Production of high purity fructose from barley syrups using semi-continuous chromatography. **Journal of Chemical technology and Biotechnology**, v.35B, p.217-228, 1985.
03. BAZÁN, J. H. V. **Estudo de produção enzimática da dextrana clínica**. Campinas, 1993. 123p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
04. BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química dos alimentos**. 2.ed. SãoPaulo: Livraria Varela, 1995. 223p.
05. BRECK, D.W. **Zeolite molecular sieves: structure, chemistry and use** New York: John Wiley & Sons, 1974. 771p.
06. BUKERT, C. ^a V. **Adsorção de fucose por zeólitas e seu efeito na síntese “in vitro” de oligossacarídeos**, 2001. Dissertação (Doutor em engenharia de alimentos) – em andamento – Faculdade de engenharia de alimentos, Universidade estadual de Campinas.
07. CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. **Alimentos para fins especiais: dietéticos**. São Paulo: Varela, 1996. p.137-144.
08. CHENG, Y. L.; LEE, T. Y. Separation of fructose and glucose mixture by zeolite Y. **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, p.498-504, 1992.

09. CURRALERO, I. C. B. **Estudo da produção de dextrana de baixo peso molecular por via enzimática, para obtenção de ferro-dextrana.** Campinas, 1993. 164p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
10. DE BELDER, A. N. Dextran. In: **Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, Ed.5°. Weinheim: W. Gerhart, 1987. v.A8, p.449-454.
11. FLANINGEN, E. M. Zeolites and molecular sieves: an historical perspective. In: BEKKUM, H.; FLANINGEN, E. M.; JANSEN, J.C. **Introduction to zeolite science and practice.** Amsterdam: Elsevier, 1991, p.13-34.
12. GUIMARÃES, D. P. **Otimização das condições de síntese e hidrólise ácida de dextrana.** Campinas, 1997. 34p. 1º Relatório de Iniciação Científica (FAPESP), processo 96/07436-1. Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade estadual de Campinas.
13. GUIMARÃES, D. P.; COSTA, F. A. A.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F. Optimization of dextran synthesis and acidic hydrolysis by surface response analysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 1999.
14. HANOVER, L. M.; WHITE, J. S. Manufacturing, composition, and applications of fructose. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.58, p.724S-732S, 1993.
15. HO, C.; CHING, C.B.; RUTHVEN, D.M. A comparative study of zeólita and resins adsorbents for the separation of fructose-glucose mixtures **Industrial Engineering Chemistry Research**, Columbus, v.26, n.7, p.1407-1412, 1987.
16. JEANES, A. R. Dextran. In: **Encyclopedia of Polymer Science and Technology.** John Wiley & Sons Inc., 1966. v.4, p.805-824.

17. JEANES, A. R. Extracellular microbial polysacharides: new hidrocolloides of interest to the food industry. **Food Technology**, v.28, p. 34-40, 1974
18. KABOLI, H.; REILLY, P. J. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. **Biotechnology and Bioengineering**, v.23, p.1055-1069, 1980.
19. KILLEY, M.; DIMLER, .J.; LUSKEY, J.E. Preparation of panose by the action of NRRL B-512 dextransucrase on a sucrose-maltose mixture **Journal of the American Chemistry Society**, v. 71, p. 3315-3318, 1955
20. LAWFORD, G. R.; KLIGERMAN, A.; WILLIAMS, T. Dextran biosynthesis and dextransucrase production by continuous culture of *Leuconostoc mesenteroides*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 21, p. 1121-1131, 1979
21. LÓPEZ-MUNGUÍA, A. C.; FUENTE, E. B.; FENTANES, E. G. Biopolímeros. In: GARIBAY, M. C.; RAMIREZ, R. Q.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. C. (Comp.) **Biotecnología Alimentária**. México: Noriega Editora, 1983 . Cap.13, p.423-445.
22. MARTINEZ-ESPINDOLA, J. P.; LOPEZ-MUNGUIA, C. A. On the kinetics of dextransucrase and dextran synthesis in batch reactors. **Biotechnology Letters**, v.7, n.7, p.483-486, 1985.
23. MIBIELLI, G.M. **Síntese do processo de obtenção de dextrana clínica e frutose a partir de sacarose**, 2001. Dissertação (mestre em engenharia de alimentos) – Faculdade de engenharia de alimentos, Universidade estadual de Campinas.
24. MILLES, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v.31, p.426-428, 1959.
25. MILLER, A. W.; ROBYT, J. F. Activation and inhibition of dextransucrase by calcium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.880, p.32-39, 1986.

26. PAUL, F.; ORIOL, E.; AURIOL, D.; MONSAN, P. Acceptor reaction of a highly purified dextransucrase with maltose and oligosaccharides. Application to the synthesis of controlled-molecular-weight dextrans. **Carbohydrate Research**, v.149, p.433-441, 1986
27. PAWAN, G. L. S. Fructose. In: BIRCH, G. G.; GREEN, L. F. **Molecular Structure and Function of Food Carbohydrate**. 1973. Cap.5: p.65-78.
28. QUEIRÓZ, J. H. **Contribuição ao estudo da produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides***. Campinas, 1987. 118p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
29. ROBYT, J. F.; KIMBLE, B.K.; WALSETH, T.F. The mechanism of dextransucrase action: direction of dextran biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.165, p. 634-640, 1974
30. ROBYT, J. F.; TANIGUCHI, H. The mechanism of dextransucrase action. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.174, p.129-135, May, 1976
31. ROBYT, J. F.; WALSETH, T. F.. The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.61, p.433-445, 1978
32. RUBY, J. E.; FUJISAWA, T.; KRETCHMER, N. Fructose adsorption. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.58, p.748-753, 1993
33. RUTHVEN, D.M. **Principles of adsorption and adsorption process** New York: John Willey & Sons Inc. 1984. 433p.
34. SANTOS, V. M. **Estudo das condições de hidrólise ácida para obtenção de dextrana clínica**. Campinas, 1996. 108p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

35. SANTOS, A.M.P. **Síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose por inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *Bulgarius***. Campinas, 2002. Dissertação (Doutor em engenharia de alimentos) – em andamento – Faculdade de engenharia de alimentos, Universidade estadual de Campinas.
36. SIDEBOTHAM, R. L. Dextran. **Adv. Carbohydrate Chem. and Biochem.**, v.30, p. 371-444, 1974.
37. SILVA, C. F. **Efeitos da troca iônica em zeólitas na adsorção da frutose**. Campinas, 1998. 96p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
38. TSUCHIYA, H. M.; KOEPESELL, H. J.; CORMAN, J.; BRYANT, G.; BOGARD, M. O.; FEGER, V. H.; JACKSON, R. W. The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of Bacteriology**, v.64, p.521-526, 1952.
39. US PATENT & TRADEMARK OFFICE, Neuzil, R.W.; Priegnitz, J.W. **Process for separating glucose from fructose by selective adsorption**. n. 4442285. 10 Apr 1984.
40. WOLF, I. A.; MEHLTRETTER, C. L.; MELLIES, R. L.; WATSON, P. R.; HOFREITER, B. T.; PATRICK, P. L.; RIST, C. E. Production of clinical-type dextran: partial hydrolytic depolymerization and fractionation of the dextran from *Leuconostoc mesenteroides* strain NRRL B-512. **Industrial and Engineering Chemistry**, v.46, p.370-377, 1954.